



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio de liberación de especies de plata a partir de aditivos basados en nanomateriales para alimentación animal

María Ballester Tena

Dirección: María Sierra Jiménez García-Alcalá
Departamento de Química Analítica, Laboratorio GEAS
Universidad de Zaragoza, 2020.

Abreviaturas empleadas

NP: Nanopartícula

AgNPs: Nanopartículas de plata

EAA-llama: Espectroscopia de Absorción Atómica en llama

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

PI: Patrón interno

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

EM: Microscopía electrónica

DLS: Dispersión dinámica de la luz

HDC: Cromatografía hidrodinámica

ICP-OES: espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente

sp-ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales

FFF: Fraccionamiento en Flujo mediante Campos

SSF: fluido oral simulado

SGF: fluido gástrico simulado

SIF: fluido intestinal simulado

ÍNDICE

Resumen

1. Introducción.....	1
1.1 Nanopartículas de plata, su utilización y caracterización.....	1
1.1.1 ICP-MS.....	4
1.1.2 EAA-Llama.....	4
1.2 Determinación del contenido total de especies de plata en muestras biológicas.....	5
1.3 Estudios de liberación de especies de plata a partir de muestras alimenticias en procesos de "digestión in vitro".....	6
2. Objetivos y planteamiento del trabajo.....	7
3. Parte experimental.....	8
3.1 Instrumentación: aparatos y materiales.....	8
3.2 Reactivos, disoluciones patrón y muestras.....	8
3.3 Procedimientos.....	9
4. Resultados y discusión.....	13
4.1 Estudio preliminar sobre las muestras: pH y conductividad.....	13
4.2 Determinación del contenido total de especies de plata en suplementos alimenticios para cerdos.....	14
4.2.1 Ataque en abierto.....	14
4.2.2 Ataque por microondas.....	15
4.3 Estudio de liberación de especies de plata a partir de suplementos alimenticios para cerdos en medio acuoso.....	16
4.3.1 Determinación por EAA-Llama.....	16
4.3.2 Determinación por ICP-MS.....	17
4.4 Estudio de liberación de especies de plata en procesos de digestión in vitro a partir de patrones de Ag(I) y AgNps.....	19
5. Conclusiones.....	21
6. Bibliografía.....	23
Anexos.	

Resumen

En la actualidad las nanopartículas de plata son utilizadas en numerosos productos comerciales debido a sus diversas propiedades. Uno de sus usos es como alternativa a los antibióticos en la producción animal, debido a sus propiedades antimicrobianas. Es importante conocer el comportamiento y caracterizar las AgNPs y especies derivadas para comprender sus aplicaciones y los posibles efectos tóxicos en el medio ambiente y la salud humana. Para realizar la caracterización se usan distintas técnicas como EM o ICP-MS, que en muchas ocasiones se combinan con técnicas de separación como AF4 para conseguir mejores análisis.

En este trabajo desde un punto de vista experimental, se plantea el uso de EAA-Llama e ICP-MS para la caracterización de AgNps y especies derivadas en aditivos alimenticios tras distintos ensayos de lixiviación para valorar las especies liberadas. Además se ha realizado un estudio sobre el pH y conductividad de las muestras en agua.

Por un lado, se ha determinado el contenido total de especies de plata en pienso para cerdos mediante ICP-MS, utilizando un ataque en abierto y un ataque en microondas para su comparación. La digestión es necesaria para diluir la muestra y degradar la matriz. El ataque se realizó con HNO_3 , necesario para estabilizar la plata y con HCl para evitar la formación de $\text{AgCl}_{(s)}$.

También se ha medido el contenido total de plata liberada en las muestras tras una lixiviación en agua mediante EAA-Llama e ICP-MS. Por último para estudiar el comportamiento teórico de distintas especies de Ag, se ha realizado una digestión "in vitro" para determinar las especies de plata liberadas a partir de patrones de Ag(I) y AgNps mediante EAA-Llama. Durante la digestión se ha comprobado que las AgNps sufren cambios en sus propiedades debido a las interacciones con los fluidos, cambios de temperatura, pH, concentraciones de sales y enzimas.

Abstract

Nowadays, silver nanoparticles are used in lots of commercial products due to their several properties. One of their uses is, as an alternative to the antibiotics in animal production, due to its antimicrobial properties. It is really important to know the behavior and typify the AgNPs and derivative species to understand its applications, thus knowing possible toxic effects in the environment and human health. In order to do this classification. Different techniques as EM or ICP-MS are being used. In many occasions these techniques are combined with separation techniques as AF4 in order to get better analysis.

In this project from an experimental point of view, it has been planned the use of flame-EAA and ICP-MS for the characterization of AgNps and derivative species in food additives after several leaching tests in order to value the released species. For doing this, a survey about pH and conductivity in some water samples has been done.

On one hand the total content of silver species in pigs' feed has been determined through ICP-MS, after an open attack and an attack in microwave for its comparison. Digestion is needed to dilute the sample and degrade the matrix. The attack was done with HNO_3 , necessary for steadying the silver and with HCl in order to prevent the formation of $\text{AgCl}_{(s)}$.

It has also been measured the total content of free silver in the samples after a leaching in water through flame-EAA and ICP-MS. Finally, in order to study the theoretical behavior of different Ag species, it has been done an "in vitro" digestion in order to determine the free silver species from Ag(I) and AgNps patterns through flame-EAA. During the digestion process, it has been verified that AgNps suffer different changes in its properties due to the interactions with fluids, temperature changes, pH and salt and enzymes' concentration.

1. Introducción

La nanotecnología se ha usado durante siglos, ya se empleaba en el 2600 a.C como tintes para fibras y tejidos. Durante la edad media se usaban nanopartículas de oro y plata para dar color amarillo y rojo rubí a las vidrieras de las iglesias. Pero no fue hasta el año 1959 en una conferencia de la Sociedad Americana de física que se hizo la primera referencia a la nanotecnología por parte del científico Richard Feynman. Norio Taniguachi fue la primera persona en utilizar la palabra nanotecnología en 1974, pero hasta 1981 con los investigadores Gerd Binnig y Heinrich Rohrer y el desarrollo del microscopio de túnel de exploración no comenzaría su desarrollo. Desde ese momento ha aumentado la producción de nanomateriales y nanopartículas en productos comerciales.¹

Las nanopartículas pueden cambiar las propiedades y tener mayor actividad que de los mismos materiales a mayor escala. Esto se debe a sus propiedades físicas y químicas como una mayor relación área superficial/volumen de las moléculas², su pequeño tamaño, su alta reactividad, su alta capacidad de soporte y la fácil variación de sus propiedades superficiales.³ Las nanomateriales según la Comisión Europea se definen como todo aquel material natural, secundario o fabricado que contiene partículas en estado disperso o en forma de agregado o aglomerado, y en el que al menos un 50% de las partículas en la granulometría numérica poseen una o más dimensiones externas en el rango de tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm.⁴

Las nanopartículas se están usando actualmente en diversos campos de investigación como la medicina, industria farmacéutica o ciencias ambientales, esto se debe a sus características y las novedades que introducen en estos campos. Pero esto también puede ser nuevas formas de toxicidad y contaminación. Actualmente se están desarrollando técnicas para medir los nanomateriales presentes en la atmósfera, medios acuáticos y terrestres para facilitar la evaluación del riesgo ecológico y se realizan estudios de los efectos de comer alimentos con nanomateriales o de cómo afectan a los trabajadores que trabajan con ellos.^{2,5}

En este trabajo se pone el foco en las nanopartículas de plata debido a uso en una variada gama de productos, concretamente en su uso como antibacteriano en suplementos alimenticios para cerdos.

1.1 Nanopartículas de plata, su utilización y caracterización.

De todos los nanomateriales que se han desarrollado y caracterizado, las AgNPs tienen una gran importancia debido a la cantidad de usos que tienen en diferentes aplicaciones comerciales. La plata es un metal blando, dúctil y maleable que tiene la conductividad más alta de todos los metales. Es un metal químicamente inactivo, estable en agua y no se oxida en el aire.

Las AgNps tienen propiedades especiales en comparación con la plata a gran escala. Estas propiedades se deben a sus características físico-químicas: área superficial, pequeño tamaño, movilidad en solución, forma, carga superficial, aglomeración..

Tienen una mayor relación área superficial/volumen de las moléculas. A medida que el tamaño de la partícula se reduce, el área superficial aumenta. Debido a esto hay una mayor proporción de átomos en la superficie que están en contacto con el ambiente y por lo tanto más fácilmente disponible para la reacción. Las propiedades de las AgNps pueden mejorarse con los recubrimientos, estos pueden influir en la carga superficial, solubilidad y la hidrofobia.⁶

Las nanopartículas de plata tienen una gran presencia en el mercado debido a sus numerosas aplicaciones. Tienen propiedades ópticas por lo que son utilizadas en catálisis, electrónica y biosensores. Las podemos encontrar en pinturas y recubrimientos para mejorar su resistencia a la abrasión, rayado, calor... También se pueden usar como aditivos para mejorar la gelificación, viscosidad, y estabilidad de los alimentos. Aunque su principal uso es como bactericida.^{1, 6}

Las AgNps se adhieren a la pared bacteriana provocando cambios estructurales y finalmente produciendo su muerte.⁷ Su uso se debe a su baja toxicidad (dependiendo de su frecuencia de uso), gran estabilidad y que las bacterias no desarrollan resistencia.⁸ Estas propiedades antibactericidas son usadas en medicina para el tratamiento de heridas o en productos médicos como en apósitos y textiles médicos. Igualmente son empleadas en productos cotidianos como aerosoles desodorantes antibacterianos, purificadores de aire, productos de limpieza, para almacenamiento de comida ... También aparece como aditivos en alimentos para reducir los organismos patógenos.¹

Las AgNps introducidas en el cuerpo en bajas cantidades no causan ningún daño, pero si se introducen en grandes cantidades pueden afectar a la salud. Las podemos captar a través de la piel, por inhalación y por el tracto gastrointestinal. Además tienen un gran impacto medioambiental por su toxicidad para los peces y vida marina, es por ello que resulta de vital importancia su caracterización.⁷

La caracterización de nanopartículas se hace por diferentes técnicas:

La microscopía electrónica (EM) nos permite visualizar las nanopartículas y obtener información sobre el tamaño, forma, estructura del cristal, composición elemental y estructura química. La EM no es útil para realizar análisis cuantitativos. Las Nps son muy reactivas además de que a la hora del acondicionamiento de los analitos a menudo implica un cambio en el entorno, estas dos cosas pueden generar un fuerte sesgo.

La EM utiliza un haz de electrones para iluminar un objeto. Como los electrones tienen una longitud de onda menor que la luz nos permite observar estructuras mucho más pequeñas. Cuando el haz de electrones choca con la superficie de la muestra, se producen diferentes interacciones (elásticas e inelásticas) entre los electrones incidentes y los átomos. Como consecuencia se producen rayos x, luz visible, electrones Auger, electrones retrodifundidos, electrones secundarios, electrones difractados, electrones transmitidos y electrones no dispersados. Cada uno de estos fenómenos proporciona una información que es captada por detectores específicos.

Todos los microscopios electrónicos tienen un cañón de electrones, lentes electromagnéticas y una pantalla.

Las limitaciones más importantes en la caracterización son la resolución espacial, la polidispersión, la generación de artefactos y las perturbaciones durante la preparación de la muestra. La EM también tiene el inconveniente de que es destructiva y requiere mucho tiempo.^{9,10,11}

La dispersión dinámica de la luz (DLS) se usa para el análisis del tamaño de partícula, nos proporciona el diámetro hidrodinámico de las partículas. El DLS mide movimiento browniano de los NP, a través de las variaciones dependientes del tiempo. Se aplica a las muestras en estado líquido y funciona bien para muestras dispersas homogéneamente. Pero en presencia de partículas grandes, agregados o aglomerados, las partículas más pequeñas no se detectan.^{9, 10, 12}

Las técnicas AAS, ICP-OES e ICP-MS se emplean para la detección y cuantificación de los elementos presentes en los nanomateriales pero no nos permite obtener información sobre el tamaño, agregación..⁹

La técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente en el modo de detección individual de partículas (sp-ICP-MS) es utilizada para la cuantificación, caracterización y detección de partículas en suspensiones líquidas. Nos proporciona información sobre el tamaño y la concentración numérica. Permite distinguir el analito en forma iónica y como partícula. sp-ICP-MS se usa para detectar Nps en envoltorios de alimentos, para realizar estudios sobre el destino de las AgNps en la digestión humana o para estudiar la liberación en aditivos alimenticios.^{9,13}

La espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) nos da información cualitativa y sobre la composición química y la distribución de las especies químicas con una preparación de muestra menor. Una ventaja es que los estados químicos originales se conservan. Uno de los usos de esta técnica es evaluar el destino de las AgNps de las aguas residuales y lodos de depuradora.^{9,10}

Las técnicas electroquímicas nos permiten cuantificar las nanopartículas y conocer la concentración, tamaño y estado de oxidación. Estas técnicas proporcionan una buena sensibilidad analítica y en combinación con electrodos desechables de una sola gota se convierten en un excelente sistema para análisis simples, rentables e in situ. La principal desventaja es que la información sobre la composición química no se puede obtener fácilmente. Hay dos técnicas electroquímicas: la voltamperometría de partículas inmovilizadas (VIP) y la coulometría de colisión de partículas (PCC). Estas técnicas han sido aplicadas para estudiar la evolución de las AgNps en agua del mar.^{9,14}

En muchos casos es necesario combinar estas técnicas con técnicas de separación para conseguir unos análisis mejores. Las técnicas de separación nos permiten separar las partículas por su tamaño, superficie, densidad y carga. Nos permite detectar y conocer el tamaño y concentración de las nanopartículas.⁹

El fraccionamiento de campo de flujo (FFF) es utilizado para la separación y caracterización del tamaño de una gran variedad de nanomateriales con diferentes composiciones, tamaños y formas. El FFF separa las partículas por tamaños y en la mayoría de los casos es necesario un pretratamiento de la muestra antes de la separación.^{9,15} Una de las técnicas de fraccionamiento más utilizadas es el fraccionamiento de campo de flujo asimétrico (AF4). El AF4 nos permite separar las partículas según su tamaño hidrodinámico a través de una membrana de ultrafiltración aplicando un flujo cruzado. La separación depende del coeficiente de difusión de partículas. Las partículas más pequeñas tienen mayores coeficientes de difusión por lo que se eluyen antes que las partículas más grandes. Se puede usar para separar Nps de matrices complejas, permite separar analitos de un amplio rango de tamaños, pero no puede distinguir el tipo de analito.^{16,17,18}

Las técnicas electroforéticas se basan en la separación de especies cargadas según su forma, tamaño y superficie. Ofrecen una caracterización fisicoquímica de las NP para diagnóstico, imagen o aplicaciones terapéuticas. Dado que los métodos electroforéticos, en formatos capilar o microfluídico, proporcionan un alto poder de resolución con tiempos de análisis cortos, requieren un bajo consumo de muestra y producen un desperdicio reducido, y ofrecen separaciones en solución libre que permiten imitar condiciones in vivo.^{9,19}

La cromatografía hidrodinámica (HDC) nos permite la separación de las partículas por su tamaño debido al gradiente de velocidades generado dentro del capilar. Una ventaja importante de HDC

sobre otras técnicas de separación por tamaño es su alta flexibilidad y robustez. Se pueden separar NPs incluso en matrices complejas pero con bajo poder de resolución. La separación por tamaño es independiente del caudal, la composición del eluyente y la carga superficial.^{9,20,21}

Es necesario combinar todas estas técnicas para poder obtener toda la información.

En este trabajo nos hemos centrado en el empleo de las técnicas de espectroscopia de absorción atómica en llama (EAA-llama) y Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

1.1.1 ICP-MS

La técnica de ICP-MS es muy importante en el análisis elemental al tener bajos límites de detección para la mayoría de los elementos, alto grado de selectividad y buena precisión y exactitud. Con esta técnica se ha conseguido determinar el 90% de los elementos de la tabla periódica. Se consiguen límites de detección de 0,0001 a 0,01 mgL⁻¹ y tiempos de medida de 10s por elemento.

La introducción de las muestras se realiza en forma de disolución mediante un nebulizador. El atomizador y el ionizador es de plasma acoplado por inducción.

Se puede utilizar para realizar determinaciones cualitativas, semicuantitativas y cuantitativa de una o más elementos en muestras.²² La técnica de ICP-MS no proporciona información sobre la forma físico-química del elemento, tamaño o agregación. Estas limitaciones se solucionan utilizando el ICP-MS como detector acoplado a una técnica de separación continua como son el fraccionamiento del flujo de campo, cromatografía hidrodinámica y electroforesis capilar.⁹

Con ICP-MS se pueden utilizar los dos isótopos naturales de Ag. Las posibles interferencias espectrales para el isótopo Ag¹⁰⁷ son los iones de Ar-Ga, Ar-Zn, Ar-Ge, Zr-O, Sr-O y Y-O. En el caso del isótopo Ag¹⁰⁹ por la presencia de los iones Ar-Ga, Ar-Ge, Nb-O, Zr-O, y Mo-O.²³

Debido a las buenas prestaciones que tiene la técnica ICP-MS, se utiliza para cuantificar AgNps en numerosos estudios. Se ha utilizado para realizar estudios de determinación de contenido total de AgNps en muestras biológicas.^{24,25,26} Wu M et al.,²⁷ estudiaron mediante ICP-MS la absorción celular de AgNps y como afecta el tamaño de las partículas a esta absorción.

En los últimos años se ha utilizado sp-ICP-MS para llevar a cabo estudios de distribución de tamaños de Nps. La técnica nos permite detectar, cuantificar y caracterizar partículas en suspensiones líquidas, cuantificarlas. El SP-ICP-MS se basa en el hecho de que cada partícula registrada es una partícula individual. La intensidad neta de cada partícula es proporcional al número de átomos del elemento a medir y por lo tanto a la masa del elemento por partícula. Si se conoce la composición, forma y densidad también es proporcional al tamaño de la partícula.¹³

Vidmar et al.,²⁸ estudiaron distintos métodos de preparación de muestras en tejidos humanos para determinar la concentración de masa y número y la distribución de tamaño de los AgNP AgNps usando esta técnica. Roman, M et al.,²⁹ realizaron un método para estudiar los procesos en los que intervienen AgNps en el plasma y sangre humana usando la cromatografía hidrodinámica acoplada con sp-ICP-MS.

1.1.2 EAA-Llama

La espectroscopia de absorción atómica en llama permite la identificación cuantitativa de más de sesenta metales. Los límites de detección están en el intervalo de 0,001 a 0,02 mgL⁻¹.

Se utiliza un atomizador de llama para la atomización. A la llama llega una solución de muestra nebulizada mediante un flujo de oxidante gaseoso mezclado con un combustible gaseoso. Es el método más reproducible de introducción de muestra líquida en espectroscopía de absorción pero tiene una menor eficiencia de muestreo.

Los átomos que se han formado son irradiados con una lámpara de cátodo hueco. La lámpara está formada por un ánodo de tungsteno y un cátodo construido del metal del que queremos hacer la determinación. Estos se encuentran en un tubo de vidrio lleno con gas neón. La lámpara emite luz a una determinada longitud de onda en función del elemento químico que se quiera medir. Los cátodos de algunas constan de una mezcla de varios metales y permiten identificar más de un elemento.²²

La determinación directa de iones metálicos en algunas muestras por EAA-llama es difícil debido a la baja sensibilidad. A menudo es necesario hacer procedimientos de preconcentración. En el caso de la plata se realizan extracciones líquido-líquido, extracción del punto de nubosidad, extracción en fase sólida y microextracción líquido-líquido dispersiva.^{23,30}

No hay muchas referencias de determinaciones de AgNps con EAA-llama. En el estudio realizado por *Wu, Hz et al.*,³¹ se determinó AgNps en muestras de agua del medio ambiente mediante EAA-llama usando una microextracción líquido-líquido dispersiva. *Choleva, TG et al.*,³² realizaron un método para cuantificar AgNps en muestras ambientales utilizando EAA y una microextracción en fase líquida.

1.2 Determinación del contenido total de especies de plata en muestras biológicas.

En este trabajo para realizar la determinación del contenido total de especies de plata en muestras de suplementos alimenticios para cerdos se van a emplear las técnicas de espectroscopia de absorción atómica y Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

Antes de realizar la determinación en muestras biológicas es necesario hacer una digestión, para que se produzca la disolución de la muestra y la degradación de la matriz. Se utilizan ácidos oxidantes y un ataque en abierto o por microondas. Para realizar el ataque en abierto se utiliza un sistema de calentamiento convencional a presión atmosférica mientras que en el ataque por microondas se utiliza un horno de microondas con el que se pueden alcanzar mayores temperaturas al controlar la presión.⁹

La estabilidad de las soluciones con plata se puede ver afectada por la luz, el pH, la temperatura y el material de recipiente. Esto puede provocar pérdidas debido a la precipitación, formación de coloides y sorción. Las muestras con bajas concentraciones de Ag no son estables en ausencia de ácido nítrico. Se puede producir la precipitación de la plata en forma de AgCl cuando hay iones cloruro en concentración no suficientemente altas.²³

En diferentes estudios para realizar la determinación del contenido total de plata mediante ICP-MS y EAA se realizó un ataque por microondas o en abierto con HNO₃ y H₂O₂.^{12,25,26,33,34,35} En los trabajos de *Veverková, L et al.*,²³ y *Daskalakis, KD. et al.*,³⁶ se observó que el uso de H₂O₂ solo aumentaba las recuperaciones cuando se utilizan muestras con un alto contenido de grasa. Con el resto de muestras no afecta significativamente a las recuperaciones. Si se observó que añadir HCl mejoraba las recuperaciones. La adición de HCl a alta concentración mejora las recuperaciones ya que favorece la formación de los complejos solubles de AgCl₂⁻ y AgCl₃²⁻ y que la plata no precipite en forma de AgCl.

^{23,37}

1.3 Estudios de liberación de especies de plata a partir de muestras alimenticias en procesos de "digestión in vitro".

Como se ha dicho anteriormente las AgNps son usadas en la industria alimentaria como aditivo debido a sus propiedades antibacterianas. Este uso ha provocado que aumente la preocupación de los posibles efectos tóxicos de las AgNps al organismo debido a su exposición prolongada.³⁷

Los experimentos in vitro son utilizados debido a que son más rápidos, más baratos, más simples y no tienen restricciones éticas en comparación con los experimentos "in vivo". Los métodos "in vitro" son empleando para estudiar diferentes cuestiones como la digestibilidad y la bioaccesibilidad de diferentes productos. Suelen incluir las fases oral, gástrica e intestinal. Con los métodos in vitro se intenta recrear las condiciones fisiológicas "in vivo" con los tiempos de digestión, pH, enzimas, concentraciones de sal...^{38,39}

Los modelos "in vitro" pueden ser estáticos y dinámicos. Los modelos estáticos intentan simular la mayoría de los parámetros fisiológicos de las diferentes partes de la digestión. Pero en ellos no se recrea el flujo de los alimentos en tiempo real a través de las distintas fases, que puede tener impacto en la descomposición de alimentos, partículas y liberación de nutrientes.

Los modelos dinámicos están más cerca de la realidad, nos da información acerca de la influencia de los flujos dinámicos, secreciones corporales, pH, temperatura y microbiota. Existen pocos simuladores de este tipo de digestión in vitro debido a su alto coste, uno de ellos es simgi®. Con este simulador se ha demostrado que el tamaño y morfología de las AgNps cambia durante la digestión debido a cambios en el pH y composición del fluido. Además de que los nanomateriales no alteran la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal.³³

En el 2014 Minekus y sus colaboradores publicaron un protocolo de digestión in vitro estático cuyo objetivo era mejorar la comparación de datos experimentales entre laboratorios. En este protocolo se establecen unas condiciones básicas cercanas a la situación fisiológica.^{38,39}

Las entradas más probables de las AgNps al organismo son por la cavidad oral y el tracto gastrointestinal. Las Nps a través de los fluidos pueden actuar sobre la capa mucosa y trasladarse al flujo sanguíneo. Una vez en el flujo sanguíneo puede cruzar el epitelio y llegar a los órganos. Se ha observado que las AgNps de un diámetro inferior a 100 nm son absorbidas por endocitosis en la células epiteliales. Las AgNps pueden causar estrés oxidativo, daño al ADN e inflamaciones. Por lo que la mayoría de los estudios sobre los efectos tóxicos se centran en la absorción intestinal y en la interacción con las distintas células.^{6,40}

La interacción de las AgNps con los distintos fluidos mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas pueden generar cambios en las propiedades originales de las AgNps. La biodisponibilidad de las AgNps durante la digestión depende en parte del tamaño de partícula inicial, la forma y el recubrimiento de la superficie. Todas estas propiedades influyen en la composición química, solubilidad y agregación durante la digestión. Durante las diferentes etapas debido a los cambios de temperatura, pH y concentraciones de sales y enzimas hay una modificación físico-química de AgNp.^{37,40,41,42}

Cuando las AgNps entran en contacto con los fluidos hay un aumento de su tamaño inmediatamente. El crecimiento se debe a los iones de las sales que aumentan la fuerza iónica del medio y provocan la agregación de las nanopartículas.

Mediante la microscopía electrónica de transmisión se ha observado que se producen interacciones proteína-nanopartículas durante la digestión. Las interacciones dependen del tamaño de las AgNps, pH y del tipo de proteína. Las AgNps adsorben por su superficie las proteínas lo que provoca cambios en las propiedades superficiales y se genera un recubrimiento llamado corona proteica. La formación de la corona proteína depende de la competencia entre las distintas proteínas.³⁷

Los componentes alimenticios con los que están las AgNps en los alimentos experimentan una transformación fuerte durante la digestión que también pueden afectar a la distribución de tamaños de las nanopartículas y a su estado de agregación.⁴⁰

Durante la fase gástrica hay un cambio morfológico de las AgNps, esto se debe a la formación de AgCl en la superficie de la partícula. Las AgNps se aglomeran y liberan iones de Ag⁺ por oxidación en presencia de medio ácido. Debido a la presencia de cloruros se forma AgCl en la superficie de las partículas.

Esto hace que el número de partículas disminuya en la digestión gástrica y luego vuelva a aumentar en la digestión intestinal. La conversión a AgCl está influenciado por el tamaño de partícula. Las AgNps más pequeñas muestran una mayor conversión a AgCl que las partículas de plata más grandes. Esto se debe a la cinética de liberación de Ag⁺ que se explica con el área superficial, las nanopartículas tienen una mayor área superficial.

La presencia de metales o especies coordinantes de iones metálicos que se encuentran en los alimentos también pueden influir en la solubilidad de la Ag.⁴¹

2. Objetivos y planteamiento del trabajo.

El objetivo de este trabajo es la caracterización de AgNps y especies derivadas en aditivos alimenticios mediante el uso de las técnicas analíticas ICP-MS y EAA-llama.

Los objetivos específicos del trabajo se describen a continuación:

- Búsqueda de información bibliográfica relacionada con Nps y con AgNps, sobre su determinación en muestras biológicas mediante las técnicas de detección atómica EAA-llama y ICP-MS y estudios de liberación en procesos de "digestión in vitro".
- Determinación de pH y conductividad de la muestra suspendida en medio acuoso.
- Determinación del contenido total de especies de plata en suplementos alimenticios para cerdos mediante ICP-MS. Realización de la determinación mediante un ataque en abierto y por microondas y comparación de los dos ataques.
- Determinación del contenido total de Ag liberada a partir de suplementos alimenticios para cerdos tras lixiviación en agua mediante EAA-llama e ICP-MS.
- Determinación de especies de plata liberadas tras el proceso de digestión in vitro (con y sin centrifugación) mediante EAA-llama a partir de patrones de Ag(I) y AgNps.

3. Parte experimental

3.1 Instrumentación: Aparatos y materiales

3.1.1 Instrumentos.

- Balanza de precisión PL-2001-L, precisión de $\pm 0,1$ mg.
- Medidor de pH micropH 2001 (Crison, Barcelona, España).
- Sonda Conductividad (Hanna Instriments)
- Espectrofotómetro de absorción atómica en llama Perkin Elmer 2380 (Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU.)
- Espectrofotómetro de absorción atómica en llama Perkin Elmer Aanalyst 200 (Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU.)
- ICP-MS Elan DRC-e Pekin Elmer (Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU.)
- ICP-MS NexION 2000 Pekin Elmer

3.1.2 Aparatos

- Micropipetas 50-1000 μL (BIOHIT PROLINE y bibby Sterilin)
- Baño de Ultrasonidos (JP Selecta S.A., Barcelona, España)
- Centrífuga Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU)
- Incubadora (OVAN, Barcelona, España).
- Sistema de agitación rotatorio Heidolph.
- Reactor microondas

3.1.3 Materiales

- Tubos Falcon de 15 y 50 mL.
- Vasos de precipitados, botes de plástico y recipientes de plástico de distintos volúmenes.
- Cuentagotas de plástico.
- Espátula de laboratorio.
- Tubos eppendorf de 2 mL.
- Frasco lavador de plástico.
- Vasos de Teflón.

3.2 Reactivos, disoluciones patrón y muestras.

3.2.1 Reactivos

- Ácido nítrico (HNO_3) 69-70% (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.)
- Ácido clorhídrico (HCl) (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.)
- Agua MiliQ obtenida a partir de agua tratada con un purificador Millipore (modelo Q-POD, Milipore Corporation, Massachusetts, EEUU)
- CaCl_2 (Scharlau, Barcelona, Spain)
- NaOH (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Pepsina (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)
- Pancreatina (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)
- Bilis (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)

3.2.2 Patrones

- Plata estándar de 994 ± 3 mg/L (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- Patrón de Rh de 1001 ± 6 mg/L (Fluka Analytical, Suiza)
- 40 nm Silver Nanospheres, Bare (citrate). Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU).

El estándar de nanopartículas se debe de sonicar antes de utilizarlo durante al menos 5 minutos para evitar su aglomeración.

3.2.3 Muestras

Se ha trabajado con diferentes muestras de suplementos alimenticios para cerdos. Las muestras utilizadas son:

- Pienso control (No contiene AgNps ni antibiótico)
- Pienso con plata (Se le ha añadido caolín que contiene AgNPs)
- Pienso con antibiótico
- Pienso con plata mas antibiotico.

El material usado para preparar las muestras y las disoluciones de patrones se sumerge previamente en una disolución al 10% (v/v) de HNO_3 en agua MilliQ durante 24h. Transcurrido el tiempo se lava con agua ultrapura y se deja secar al aire.

Las disoluciones se prepararon por pesada en la balanza de precisión para poder calcular con exactitud las concentraciones ya que las micropipetas tienen una elevada incertidumbre. Para ello se ha considerado que la densidad de las disoluciones es 1 g mL^{-1} .

3.3 Procedimientos

3.3.1 Estudios preliminares sobre la muestra: pH y conductividad.

Para llevar a cabo este estudio se preparó suspensiones de muestra en agua Mili-Q. Se pesó 50 mg de muestra y se llevó hasta un volumen de 50 mL. Los pesos exactos se muestran en la tabla A1 de Anexos.

Las muestras utilizadas fueron: pienso control, pienso con plata, pienso con antibiótico y pienso con plata y antibiótico. Se hizo dos réplicas de cada muestra. Se dejó agitar durante 1 hora y se midió el pH y la conductividad.

3.3.2 Determinación del contenido total de Ag en suplementos alimenticios para cerdos mediante ICP-MS.

3.3.2.1 Ataque en abierto.

Para determinar el contenido total de plata en los piensos se hizo un ataque ácido con una mezcla de $7 \text{ HNO}_3 \cdot 3 \text{ HCl}$. Para ello se añadió 0,1 g de muestra a los vasos de teflón y se añadió 10 mL de la mezcla ácida. Las muestras utilizadas fueron el pienso control y el pienso con plata. Se hicieron dos réplicas de cada muestra, un blanco, una recuperación del ataque en blanco, y una recuperación del ataque del pienso con plata. Para hacer las recuperaciones hay que añadir la misma cantidad de plata que tiene la muestra. La muestra de pienso con plata tiene en torno 0,017 mg de Ag por gramo de pienso, por lo que añadimos 0,17 ml de una disolución de Ag^+ de 10 mgL^{-1} preparada a partir del patrón comercial, además del peso de pienso correspondiente.

Una vez añadida la mezcla ácida a los vasos de teflón, se llevó a un baño de arena para calentarlo y favorecer el ataque. Estas disoluciones se tuvieron en caliente hasta que dejaron de salir vapores de color anaranjado, que corresponden a vapores de nitroso, ya que en ese momento termina el ataque.

Una vez concluido el ataque se transvasa el producto que quedó en los vasos de teflón a tubos de 15 mL que se completaron con HCl al 3%. Estos tubos se llevaron a centrifugar 17 min a 5000 rpm. Con ello conseguimos que en el sólido queden las partículas de un tamaño mayor a 0,2 μm .

Para poder medir en el ICP-MS se hizo una dilución de las muestras para tener una concentración de plata de 5 μgL^{-1} . Para ello se cogió 0,7 mL del sobrenadante tras la centrifugación y se llevó a un volumen final de 15 mL con un diluyente formado por un 2% de HNO_3 y un 6% de HCl en agua Mili-Q.

A parte de estas 7 muestras se preparó un blanco (diluyente), una recuperación de la medida del pienso control y del pienso con plata. Para preparar las recuperaciones de la medida, se cogió de una de las muestras de control y de una de las muestras de pienso de plata 0,7 mL del sobrenadante tras la centrifugación, se añadió 7,5 μL de una disolución de Ag^+ de 10 mgL^{-1} preparada a partir del patrón comercial y se llevaron a un volumen final de 15 mL con un diluyente formado por un 2% de HNO_3 y un 6% de HCl en agua Mili-Q.

Para llevar a cabo la determinación mediante ICP-MS se preparó una recta de calibrado de Ag^+ con 1% de HNO_3 de concentraciones: 1 ; 5 ; 10 y 15 μgL^{-1} . También se preparó una disolución de Rodio de 10 μgL^{-1} con HNO_3 al 1% a partir del patrón comercial. La disolución de Rh es utilizada como patrón interno para hacer la calibración, de esta forma se corrige posibles efectos de imprecisión.

3.3.2.2 Ataque por microondas.

Para determinar el contenido total de plata en los pienso mediante un ataque ácido por microondas, las muestras utilizadas fueron las mismas que en el ataque en abierto, el pienso control y el pienso con plata. En vasos de teflón se añadió 0,1 g de muestra, 7 mL de HNO_3 y 3 mL de HCl. Se hicieron tres replicas de cada muestra, un blanco de ataque, una recuperación del ataque en blanco, una recuperación de ataque y una recuperación de medida del pienso con plata. Las recuperaciones fueron preparadas añadiendo 0,17 mL de una disolución de Ag^+ de 10 mgL^{-1} preparada a partir del patrón comercial.

Una vez pesadas las muestras y añadidos los reactivos correspondientes, se cerraron los vasos de teflón y se introdujeron en el microondas. El ataque en microondas permite alcanzar mayores temperaturas y que sea más rápido. La digestión se realizó a 200°C, 800 psi durante 30 min.

Una vez concluido el ataque se transvasa el producto de los vasos de teflón a tubos de 50 mL que se completaron con HCl al 3%. De acuerdo al trabajo de *Abad-Álvarez Et al.*⁴³ para la determinación total de Ag en muestras en vivo estas son las condiciones ideales. Estos tubos se llevaron a centrifugar 17 min a 5000 rpm. Con ello conseguimos que en el sólido queden las partículas de un tamaño mayor a 0,2 μm .

Para poder medir en el ICP-MS se hizo una dilución de las muestras, se cogió 7,4 mL del sobrenadante tras la centrifugación y se llevó a un volumen final de 50 mL con HCl al 3%.

El software empleado para realizar la determinación mediante ICP-MS es ELAN. Antes de realizar la determinación hay que hacer una optimización con una disolución recomendada por el fabricante que contiene In, U, Mg, Ba y Ce. Con esta optimización se consigue tener una buena sensibilidad y unos niveles de óxidos e iones divalentes bajos. Para considerar unas condiciones adecuadas los niveles de CeO y Ba²⁺ tienen que ser inferiores al 3%.

Después de realizar esta optimización hay que seleccionar el elemento a medir, en nuestro caso los dos isótopos de plata. Hay que hacer otra optimización para seleccionar el voltaje de la lente y el flujo de gas del nebulizador para tener la mejor sensibilidad posible pero en este caso se hace con una disolución de Ag⁺ de 10 µg L⁻¹ al 1% de HNO₃. Las condiciones instrumentales empleadas para determinar la cantidad de plata liberada tras el ataque mediante ICP-MS se encuentran en la tabla B.2.1 de Anexos.

3.3.3 Determinación de la cantidad de Ag liberado en agua mediante EAA-llama e ICP-MS.

Para determinar la cantidad de Ag liberada procedente de suplementos alimenticios para cerdos en medio acuoso se realizan ensayos de lixiviación. Para ello se mantiene la muestra en contacto con agua Mili-Q y en agitación durante diferentes tiempos.

Para realizar los diferentes ensayos se preparó las muestras con 50 mg del pienso con plata en 50 mL de agua MiliQ. Se preparó dos réplicas para cada uno de los ensayos y un blanco.

Las disoluciones se mantuvieron en agitación durante distintos tiempos (10 min, 1h, 4h, 24h, 48h), para saber qué cantidad de plata se libera con el tiempo. Una vez concluido el tiempo de cada ensayo se llevó a centrifugar a 5000 rpm durante 17 min para eliminar la presencia de sólidos superior a 0,2 µm.

Para llevar a cabo la determinación mediante EAA-llama se preparó una recta de calibrado de Ag⁺ con 1% de HNO₃ de concentraciones: 0; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 y 4 mg L⁻¹. Para ello, se realizó una dilución intermedia de Ag⁺ de 100 mg L⁻¹ con 1% de HNO₃ a partir del patrón comercial. De esta disolución se tomaron 0; 0,075; 0,15; 0,3 ; 0,45 ; 0,6 mL y se enrasó hasta 15 mL con HNO₃ al 1%. Los pesos exactos se encuentran en la tabla C.1.1 de Anexos . Las condiciones instrumentales empleadas para determinar la cantidad de plata liberada tras la lixiviación mediante EAA-llama se encuentran en la tabla C.1.2 de Anexos.

Para llevar a cabo la determinación mediante ICP-MS se preparó una recta de calibrado de Ag⁺ con 1% de HNO₃ de concentraciones: 0; 1 ; 5 ; 50 y 100 µg L⁻¹. Para ello, se realizó una dilución intermedia de Ag⁺ de 1 mg L⁻¹ al 1% de HNO₃ a partir del patrón comercial. De esta disolución se tomaron 0; 0,05; 0,25; 2,5 y 0,5 mL y se enrasó hasta 15 mL con HNO₃ al 1%. Las condiciones instrumentales empleadas para determinar la cantidad de plata liberada tras la lixiviación mediante ICP-MS se encuentran en la tabla C.2.1 de Anexos.

3.3.4 Determinación de la cantidad de Ag liberado en procesos de digestión in vitro a partir de patrones de Ag(I) y AgNps.

La determinación se hizo de acuerdo con el protocolo de digestión de Minekus y col. (Minekus et al., 2014)³⁹ que fue modificado para cerdos por Egger y col. (Egger et al., 2017)³⁸

Para cuantificar la cantidad de Ag liberada en la digestión se preparó los fluidos simulados (oral, gástrico e intestinal) y las disoluciones de enzimas (pepsina porcina, pancreatina y bilis) antes de empezar a preparar las disoluciones de digestión.

En la preparación de los 3 fluidos simulados, oral (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF) se añadió las sales recogidas en la siguiente tabla:

Tabla 1: Composición de los fluidos simulados.

Sales	SSF (mL)	SGF (mL)	SIF (mL)
KCl (37,5 g L ⁻¹)	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄ (68 g L ⁻¹)	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃ (84 g L ⁻¹)	6,8	12,5	42,5
MgCl ₂ · (H ₂ O) ₆ (30,5 g L ⁻¹)	0,5	0,4	1,1
NaCl (117 g L ⁻¹)		11,8	9,6
(NH ₄) ₂ CO ₃ (48 g L ⁻¹)	0,06	0,5	

Se prepararon 400 mL de cada fluido. Una vez añadidas las sales se añadió agua Mili-Q hasta los 400 mL. El pH óptimo para cada fluido es 7 para SSF, 3 para SGF y 7 para SIF. Para llevarlos al pH adecuado se utilizó NaOH 1M y HCl 3M.

Estos fluidos estaban preparados previamente en el laboratorio por lo que no fue necesario realizarlos.

Las disoluciones de enzimas necesarias para llevar a cabo el proceso de digestión se prepararon con agua Mili-Q y se recomienda que estén a 37°C. Las concentraciones de cada disolución son:

- Pepsina porcina: 25000 U mL⁻¹, se añaden 4,4 mg de pepsina porcina en 10 mL de agua Mili-Q
- Pancreatina: 800 U mL⁻¹, se añaden 4 g de pancreatina en 40 mL de agua Mili-Q.
- Bilis: 160 mM, se añaden 1,25 g de bilis en 10 mL de agua Mili-Q.

Cuando las disoluciones de enzimas y los fluidos simulados estuvieron preparados, se comenzó a preparar las disoluciones de digestión. Las muestras utilizadas en este proceso son los patrones de Ag(I) y AgNps. Para la Ag(I) se preparó una dilución intermedia de 100 mgL⁻¹ con HNO₃ al 1% a partir del patrón comercial de 1000 mgL⁻¹.

En cada una de los procesos de digestión se añadió diferentes sales, fluidos y enzimas cuyas cantidades se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2: Composición de las disoluciones de digestión.

	Oral (mL)	Gástrico (mL)	Intestinal (mL)
SSF/SGF/SIF	3,5	7,5	11
CaCl ₂ · (H ₂ O) ₂	0,025	0,005	0,04
Pepsina porcina	-	1,6	-
Bilis	-	-	2,5
Pancreatina	-	-	5
HCl	-	0,2	-
NaOH	-	-	0,15

Las cantidades de muestra que tiene que haber la fase oral es de 1 mgL⁻¹ para las AgNps y 5 mgL⁻¹ para la Ag(I). Como el volumen final de estas fase fue de 10 mL, hay que añadir 0,5 mL de AgNps o de la disolución de Ag(I) de 100 mgL⁻¹. El volumen final de la disolución de la segunda fase fue 20 mL y el de la tercera 40 mL que se completó con agua Mili-Q. Los pesos exactos se encuentran en las tabla D1,D3,D5,D7 y D9 de Anexos.

Una vez se preparó las disoluciones de digestión se metieron en la incubadora a 37°C en agitación a 99 rpm. La primera etapa se dejó 2 minutos, la segunda 2 horas y la tercera 2 horas más. Tras cada etapa y antes de añadir los componentes de la siguiente fase, se sonicaron las disoluciones durante 5 minutos.

Una vez acabado el tiempo de la fase y antes de medir se centrifugo las disoluciones de digestión durante 17 min y 5000 rpm. Tras la centrifugación se cogió 6 mL del sobrenadante y se llevó a un tubo de 15 mL. Las disoluciones se deben medir en el mismo día.

Para llevar a cabo el análisis mediante EAA-llama se preparó una recta de calibrado de Ag⁺ con 1% de HNO₃ de concentraciones: 0; 0,25 ; 1 ; 3 ; 5 y 7 mgL⁻¹. Para ello, se realizó una dilución intermedia de Ag⁺ de 100 mgL⁻¹ con 1% de HNO₃ a partir del patrón comercial. De esta disolución se tomaron 0; 0,037; 0,15; 0,45 ; 0,75 ; 1,05 mL y se enraso hasta 15 mL con HNO₃ al 1%. Los pesos exactos se encuentran en la tabla D11, D13 y D15 en Anexos. Los parámetros analíticos de estas rectas se encuentran en las tablas D12, D14 y D16.

Antes de realizar la determinación mediante EAA-llama hay que optimizar el espectrofotómetro para trabajar con las condiciones adecuadas. Hay que optimizar la longitud de onda, la intensidad de corriente, anchura de rendija del monocromador, la posición del quemador y de la lámpara. Los parámetros instrumentales empleadas para determinar la cantidad de plata liberada después de la digestión mediante EAA-llama se encuentran en la tabla D17 de Anexos.

4. Resultados y discusión.

4.1 Estudio preliminar sobre las muestras: pH y conductividad.

Para llevar a cabo este estudio como se indica en el punto 3.3.1 se hizo una lixiviación en agua de las muestras de pienso durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se hicieron 3 medidas de cada muestra. En la siguiente tabla se muestran las media y DSR de cada muestra.

Tabla 3: Medidas de pH y conductividad.

Muestra	pH	DSR %	Conductividad ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	DSR %
Agua Mili-Q	5,53	0,18	378	0,3
Pienso control	6,31	0,90	70	5,11
Pienso con plata	5,83	1,2	60,3	5,41
Pienso con antibiótico	6,23	1,1	59,8	19,6
Pienso con plata y antibiótico	5,44	9,6	60,3	5,41

La conductividad del agua Mili-Q es de $378 \mu\text{s cm}^{-1}$, un valor bajo que es debido a la baja cantidad de iones que tiene. La lixiviación de las muestras de pienso en el agua hace que disminuya el valor de la conductividad.

La muestra de pienso con plata y antibiótico tiene un pH ligeramente más ácido que el agua Mili-Q, mientras que la muestra de pienso control, pienso con plata y pienso con antibiótico tienen un pH ligeramente más básico.

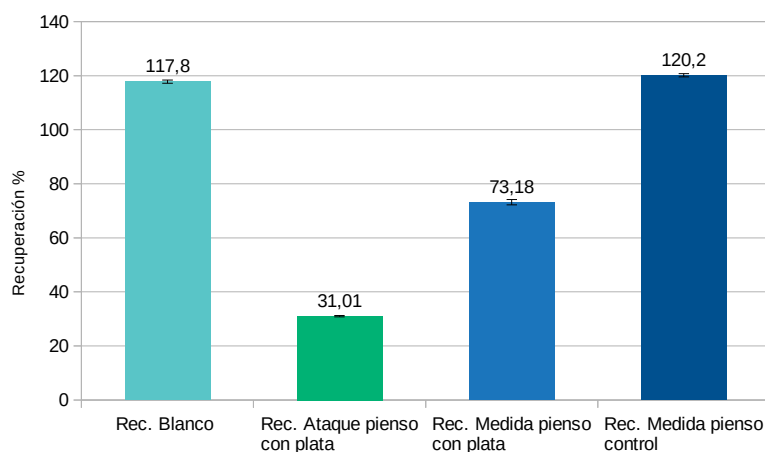
4.2 Determinación del contenido total de especies de plata en suplementos alimenticios para cerdos.

En los dos ataques se realizó la determinación mediante ICP-MS y se utilizó la misma recta de calibrado. Aunque se midieron los dos isótopos de Ag, la recta de calibrado usada es la del isótopo de plata ^{107}Ag con patrón interno. Los pesos y concentraciones utilizadas para realizar la recta de calibrado y las intensidades obtenidas se recogen en la tabla B1 de Anexos. Los parámetros analíticos y la gráfica de la recta de calibrado se muestran en la tabla B2 y gráfica B1 de Anexos.

La recta es: $y = 294,1x + 0,0045$ $R^2 = 0,9999$

4.2.1 Ataque en abierto

En la tabla B.1.1 de Anexos, se muestra la tabla con los pesos y concentraciones teóricas de las muestras. En la tabla B.1.2 de Anexos se muestran los resultados de concentración y recuperación obtenidos para las distintas muestras analizadas. En el gráfico 1 observamos las recuperaciones del blanco, del ataque de la muestra pienso con plata, de la medida de la muestra pienso con plata y de la medida de la muestra pienso control.

**Gráfico 1:** Recuperaciones del ataque en abierto.

Como se observa la recuperación para el blanco es próxima al 100% (ligeramente superior) luego no hay pérdidas de Ag. La recuperación de la medida del pienso plata está en torno al 75% y la del pienso control al 120% lo que indica que al adicionar la plata después del ataque no hay problema de pérdidas, sino que la pérdida de la Ag se produce durante el ataque como muestra la recuperación del ataque de muestra que es 31,01%.

Que los valores de concentraciones sean tan diferentes entre sí para las dos muestras, pienso plata 1 y pienso plata 2 se puede deber a diferentes causas. El ataque de las diferentes muestras duro diferente tiempo y se les tuvo que añadir diferentes cantidades de mezcla ácida. También durante el ataque se puede perder muestra con los vapores que se producen y se condensan en los vidrios de reloj. Por estas causas el ataque no es igual en todas las muestras y no se obtienen resultados reproducibles para la misma muestra.

Los resultados de las dos réplicas diferentes para una misma muestra son imprecisos. Esto se puede observar con los valores de la SD o DSR de las concentraciones para la muestra del pienso control y del pienso con plata que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4: Concentraciones obtenidas de los piensos con sus desviaciones.

Muestra	Concentración mg g ⁻¹	SD	DSR
Pienso control	1,802x10 ⁻³	0,0004	24,2%
Pienso con plata	4,426x10 ⁻³	0,0028	62,8%

4.2.2 Ataque en microondas

En la tabla B.2.2 de Anexos se muestra la tabla con los pesos y concentraciones teóricas de las muestras. Los resultados de concentración y recuperación obtenidos para las distintas muestras analizadas se recogen en la tabla B.2.3 de Anexos. En el gráfico 2 se muestran las recuperaciones del blanco, de la medida de la muestra pienso con plata y del ataque de la muestra pienso con plata.

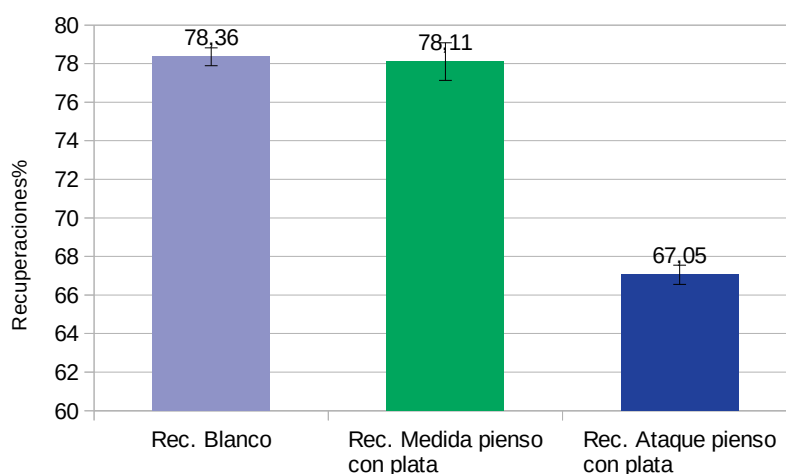


Gráfico 2: Recuperaciones del ataque por microondas.

Observamos que todas las recuperaciones son elevadas. La recuperación del blanco es próxima al 80%, hay algo de pérdida de Ag. La recuperación de la medida está entorno al 80% lo que indica que al adicionar la plata después del ataque no hay problema de pérdidas. La recuperación del ataque es mayor que en el ataque en abierto, es próxima al 70% por lo que en este caso no tenemos pérdidas de Ag en el ataque. En el gráfico 3 se muestran las concentraciones obtenidas para las tres réplicas

diferentes del pienso con plata. En la tabla 5 se recogen los valores de concentración media obtenida a partir de las 3 réplicas distintas y sus desviaciones estándar.

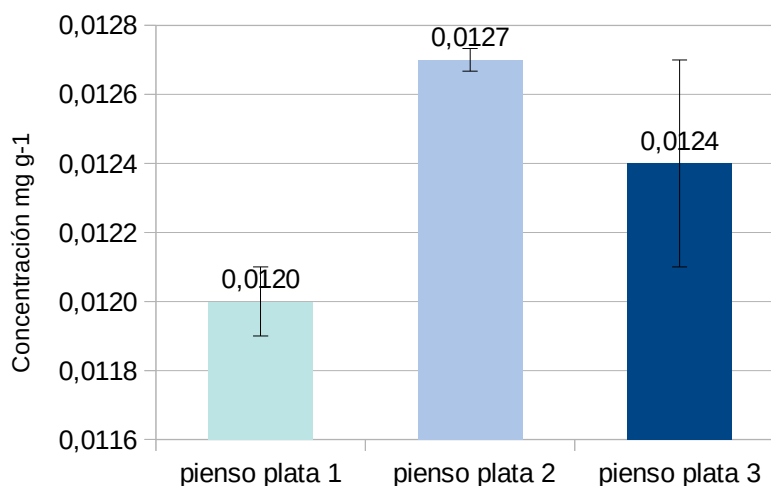


Gráfico 3: Concentraciones de la muestra de pienso con Ag obtenidas tras el ataque por microondas.

Tabla 5: Concentraciones obtenidas de los pienso con sus desviaciones.

Muestra	Concentración mg g ⁻¹	SD	DSR %
Pienso control	8,121 x10 ⁻⁵	8,938 x10 ⁻⁵	0,01
Pienso con plata	0,01239	0,0004	3,02

La concentración medida de la muestra a del pienso con plata es de 0,01239 mg g⁻¹. La DSR de las medidas es muy pequeña comparado con las medidas realizadas con el ataque en abierto donde las medidas difieren mucho. Ocurre lo mismo con la muestra de pienso control, la DSR es mucho más pequeña que en el caso del ataque en abierto.

4.3 Estudio de liberación de especies de plata a partir de suplementos alimenticios para cerdos en medio acuoso.

4.3.1 Determinación por EAA-llama

Para la cuantificación de la Ag total se utilizó una calibración externa. Para la estabilidad de la plata es necesario añadir a los patrones una concentración de 1% de HNO₃. Se ha estudiado si influye la forma de preparación. Para saber si hay diferencias significativas entre enrasar con una disolución de HNO₃ al 1% o añadir un volumen de HNO₃ al 10% y luego enrasar con agua Mili-Q, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos con cada una de las formas de preparación. Las rectas de calibrado se prepararon con disoluciones de concentración 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 10 mg L⁻¹ de Ag(I). Estas se prepararon a partir de una disolución intermedia de 80 mg L⁻¹ de Ag⁺.

Para la recta de calibrado preparada con HNO₃ al 10% y luego con agua Mili-Q las cantidades utilizadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla C.1.2 de Anexos.

La recta obtenida es: $y = 0,048x + 0,002$ $R^2 = 0,998$

En el gráfico C.1.1 de Anexos se muestra la recta de calibrado obtenida al añadir HNO₃ al 10% y luego enrasar con agua Mili-Q y en la tabla C.1.3 de Anexos se recoge los parámetros analíticos de esta recta.

Para la recta de calibrado preparada con HNO_3 al 1% las cantidades utilizadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla C.1. 4 de Anexos.

La recta es: $y = 0,044x - 0,001$ $R^2 = 0,994$

En el gráfico C.1.2 de Anexos se muestra la recta de calibrado obtenida al prepararse con HNO_3 al 1% y en la tabla C.1.5 de Anexos se recoge los parámetros analíticos de esta recta.

Comparando las pendientes de las rectas preparadas de diferente manera con un test estadístico y asumiendo que la probabilidad de que sean diferentes es aleatoria, se observó que la diferencia no es significativa ya que la probabilidad con una significatividad del 95 % es superior al 5%. Con esto podemos afirmar que no influye el modo en el que preparamos las rectas de calibrado. El método elegido para preparar las rectas de calibrado es con HNO_3 al 1% ya que es más rápido. En la tabla C.1.6 de Anexos se muestra los datos de la comparación de pendientes de la recta de calibrado.

Para llevar a cabo la determinación de plata tras la lixiviación en medio acuoso se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.3.3. Se realizó una recta de calibrado cuyas concentraciones y absorbancias se recogen en la tabla C.1.7 de Anexos. En el gráfico C.1.3 de Anexos se muestra la recta de calibrado y en la tabla C.1.8 se recoge los parámetros analíticos de esta recta.

La Recta es: $y = 0,035x - 0,001$

Los resultados de Ag liberada obtenidos para las muestras de pienso se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6: Cantidades de muestra, absorbancias y concentraciones obtenidas en el estudio.

Muestra	Pienso con plata (g)	Peso total (g)	Absorbancia	SD	Concentración obtenida (mg L^{-1})	Promedio (mg L^{-1})	SD	DSR %
M1 10 min	0,0484	50,04	0,001	0,000	0,052 < LC	0,057	0,007	12,0
M2 10 min	0,0506	50,24	0,001	0,001	0,062			
M1 1h	0,0506	50,04	0,002	0,001	0,071	0,076	0,007	8,95
M2 1h	0,0500	49,97	0,002	0,000	0,081			

Los valores de concentración obtenidos son muy bajos, están por debajo del límite de cuantificación por lo que no se pueden cuantificar. Por ello solo se realizó los ensayos de 10 minutos y de 1 hora, y se repitió la misma determinación mediante ICP-MS.

4.3.2 Determinación por ICP-MS

Para llevar a cabo la determinación de plata tras la lixiviación en medio acuoso se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.3.3. Se han realizado rectas de calibrado con y sin patrón interno midiendo los dos isótopos de Ag¹⁰⁷ y Ag¹⁰⁹. De los dos isótopos de plata, la recta de calibrado del ¹⁰⁹Ag sin patrón interno fue la que dio mayor coeficiente de correlación por lo que fue la recta elegida para la interpolación de los valores de intensidad de las muestras. Los pesos y concentraciones utilizados para realizar la recta de calibrado y las intensidades obtenidas se recogen en la tabla C.2.2 de Anexos. Las ecuaciones de la recta se muestran en las figuras C.2.1, C.2.2, C.2.3 y

C.2.4 de Anexos. La recta elegida y sus parámetros analíticos que se recogen en la tabla C.2.3 de Anexos.

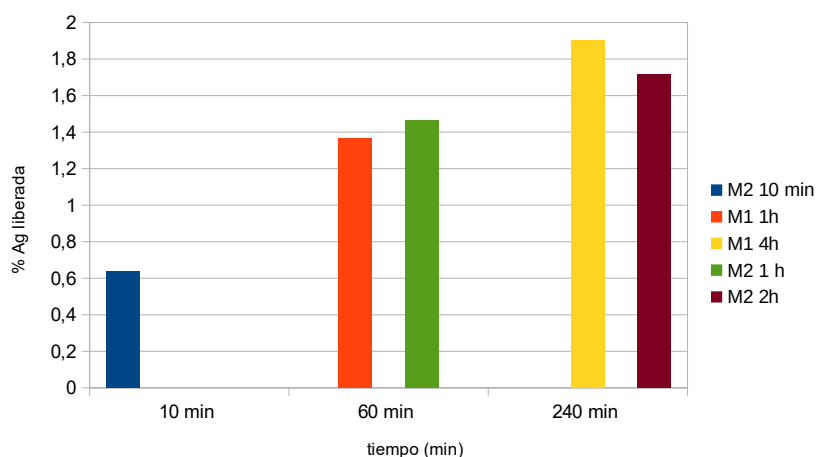
La recta es: $y = 5094,7x + 1406,5$ $R^2 = 1,0000$

Los resultados de Ag liberada obtenidos para las muestras de pienso (se hicieron dos réplicas distintas para cada tipo de pienso) se detallan en la tabla 7. Teniendo en cuenta la concentración total de los piensos que se muestra en la tabla 7 se ha calculado el porcentaje de plata liberada para tipo de muestra en función del tiempo.

Tabla 7: Intensidades, Concentraciones y recuperaciones de las muestras.

Muestra	Intensidad Ag 107	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentración mg g^{-1}	SD	% de plata liberada
M1 10 min	1636	0,0450			
M2 10 min	1958	0,1082	0,0064	0,0018	0,635%
M1 1h	2571	0,2286	0,0136	0,0018	1,363 %
M2 1h	2682	0,2504	0,0146	0,0012	1,464 %
M1 4h	3056	0,3238	0,0190	0,0012	1,900 %
M2 4h	2920	0,2971	0,0171	0,0052	1,714 %
M1 24 h	770	-0,1249			
M2 24 h	750	-0,1289			

La concentración obtenida en una de las muestra que estuvo 10 min en agitación está por debajo del límite de concentración. Con las muestras observamos que a medida que aumenta el tiempo de agitación la cantidad de plata liberada aumenta. A partir de las 24 horas la cantidad de plata liberada ha disminuido, esto se puede deber a que la plata liberada en la disolución no es estable. Como observamos que a partir de las 24 horas la concentración daba negativa no se realizó el ensayo de las 48 horas. En el gráfico 4 se muestra como varia % de plata liberada en función del tiempo.



Gráfica 4: % de plata liberada en función del tiempo

4.4 Estudio de liberación de especies de plata en procesos de digestión "in vitro" a partir de patrones de Ag(I) y AgNps.

Para llevar a cabo este estudio de liberación de especies de plata en el proceso de digestión "in vitro" se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.3.4. Este estudio se ha realizado con disoluciones patrón de plata iónica y nanopartículas de plata para estudiar su comportamiento y posteriormente poder aplicarlo al proceso de digestión in vitro de piensos (aunque en este trabajo no se ha podido realizar). Se realizaron rectas de calibrado para cada uno de los días que se hicieron las medidas por EEA-llama. Las concentraciones, pesos y absorbancias de cada una de las rectas se recogen en las tablas D11, D13 y D15 en el Anexo. Las gráficas de estas rectas se encuentran en los gráficos D1, D2 y D3 de Anexos y los parámetros analíticos en las tablas D12, D14 y D16 en el Anexo.

RECTA 1: $y = 0,028x + 0,002$ $R^2 = 1,000$

RECTA 2: $y = 0,064x + 0,004$ $R^2 = 1,000$

RECTA 3: $y = 0,053x + 0,005$ $R^2 = 0,999$

Los resultados de la plata liberada en las distintas fases del proceso de digestión in vitro para los patrones de Ag y AgNps se recogen en las siguientes tablas. Los valores de absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro para cada una de las muestras de la fase oral, gástrica e intestinal con centrifugación se recogen en las tablas D2, D4 y D6 en Anexos. Los resultados de la fase oral y gástrica se obtuvieron con la recta 1 mientras que para la fase intestinal se hizo con la recta 2.

Tabla 8: Resultados fase oral con centrifugación.

Muestra	Concentración teórica (mg L ⁻¹)	Concentración Ag EAA-llama (mg L ⁻¹)	DSR	% de plata liberada
Ag (I)	4,99	0,071	0,08%	1,42%
AgNPs	0,986	0,232	10,9 %	23,6%

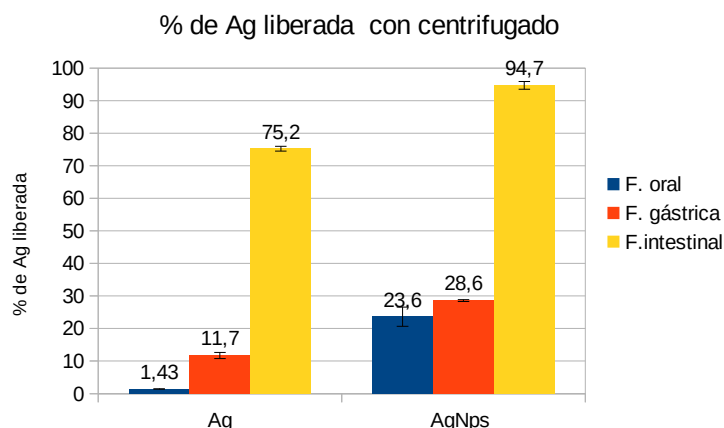
Tabla 9: Resultados fase gástrica con centrifugación.

Muestra	Concentración teórica (mg L ⁻¹)	Concentración Ag EAA-llama (mg L ⁻¹)	DSR	% de plata liberada
Ag (I)	2,55	0,298	6,93%	11,7%
AgNPs	0,499	0,143	0,21 %	28,6%

Tabla 10: Resultados fase intestinal.

Muestra	Concentración teórica (mg L ⁻¹)	Concentración Ag EAA-llama (mg L ⁻¹)	DSR	% de plata liberada
Ag (I)	1,24	0,932	0,56 %	75,2 %
AgNPs	0,229	0,229	3,21 %	94,7 %

El porcentaje de plata liberada es mayor para las nanopartículas de plata que para la plata iónica. A medida que pasan las fases los porcentajes de plata liberada también son mayores llegando a recuperar el 75% para plata iónica y casi el 100% para AgNPs en la fase intestinal. En el gráfico 5 se muestra el porcentaje de plata liberada en las distintas fases de digestión para la plata iónica y para AgNps.



Gráfica 5: Plata liberada en las diferentes fases de digestión

Debido a los bajos porcentajes de plata liberada obtenidos en la fase oral e intestinal, se realizó el mismo procedimiento pero sin centrifugar antes de medir. El proceso de centrifugación puede llevar consigo que la plata precipite con los Cl^- que llevan los fluidos gástricos. Los valores de absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro para cada una de las muestras de la fase oral y gástrica sin centrifugación se recogen en las tablas D8 y D10 en Anexos. Los resultados obtenidos para cada una de las fases se recogen en las siguientes tablas. La recta de calibración utilizada para obtener los resultados es la recta 3.

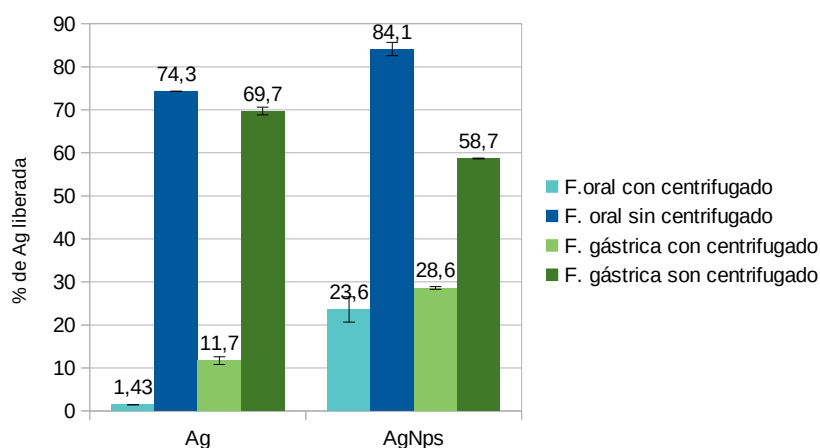
Tabla 11 : Resultados fase oral sin centrifugar.

Muestra	Concentración teórica (mg L^{-1})	Concentración Ag EAA-llama (mg L^{-1})	DSR	% de plata liberada
Ag (I)	4,94	3,69	1,29 %	74,3%
AgNPs	0,976	0,821	2,71 %	84,1 %

Tabla 12: Resultados fase gástrica sin centrifugar.

Muestra	Concentración teórica (mg L^{-1})	Concentración Ag EAA-llama (mg L^{-1})	DSR	% de plata liberada
Ag (I)	2,50	1,74	0,03 %	68,4 %
AgNPs	0,487	0,286	0,02%	69,7 %

Los porcentajes de plata liberada en el proceso sin centrifugar son mayores que los obtenidos en el proceso en el que se centrifuga antes de medir. Esto se puede deber a que al centrifugar la plata precipita y se queda en el sólido. También observamos que las recuperaciones de la fase gástrica son menores que las de la fase oral cuando no se centrifuga. En la gráfica 6 se muestra una comparación de los % de plata liberados entre fases cuando hay centrifugación y cuando no para la plata iónica y para AgNps.



Gráfica 6: Comparación recuperaciones entre fases con y sin centrifugación.

5. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se extraen de este estudio son las siguientes:

- Las AgNps tienen numerosas aplicaciones pero su principal uso es como bactericida. Se utilizan diferentes técnicas para su caracterización, es necesario combinarlas para poder obtener toda la información.
- La técnica ICP-MS presenta muy buenas prestaciones por lo que es utilizada en numerosos estudios para cuantificar AgNps. En muchas ocasiones se acopla con técnicas de separación para solucionar sus limitaciones y obtener análisis mejores.
- Con la técnica de EAA-llama se puede cuantificar más de sesenta metales pero debido a su baja sensibilidad a menudo hay que realizar procedimientos de preconcentración. No hay muchas referencias para determinar AgNPs, pero hay estudios de su cuantificación en muestras ambientales.
- El estudio del pH y conductividad indica que al poner en contacto las muestras sólidas con agua disminuye la conductividad y el pH se vuelve más básico en todas las muestras a excepción del pienso con antibiótico y plata que tiene un pH inferior al del agua.
- Para realizar la determinación total de especies de plata en suplementos alimenticios hay que realizar antes una digestión para degradar la matriz y poner en disolución la muestra. La digestión puede hacerse mediante un ataque ácido en abierto o usando microondas. En el ataque hay que utilizar HNO₃ para estabilizar la Ag en disoluciones en bajas concentraciones y HCl para favorecer la formación de AgCl₂⁻ y AgCl₃²⁻ y evitar que la plata precipite en forma de AgCl.

En el ataque en abierto se producen pérdidas de plata durante el ataque, las recuperaciones son entorno al 30%. Los resultados de concentraciones obtenidos para el pienso control y el pienso con plata son imprecisos y no son reproducibles. En el ataque por microondas sin embargo no se observan pérdidas de plata y los resultados de concentraciones obtenidas tienen DSR muy bajas en comparación con el ataque en abierto.

- Para realizar la calibración y detección de plata por EAA-llama se decidió preparar las muestras con una disolución de HNO₃ al 1%. No existen diferencias significativas entre los dos métodos estudiados que difieren en la preparación de las disoluciones patrón, por lo que se eligió preparar la recta con el método que se tardaba menos en prepararla.

La cantidad de Ag liberada en agua aumenta a medida que aumenta el tiempo de agitación. A partir de las 24 horas la cantidad de plata liberada ha disminuido. Los valores de concentración obtenidos con EAA-Llama están por debajo del límite de cuantificación y por ello se realizó la determinación con ICP-MS.

- Durante la digestión las AgNps sufren modificaciones en sus propiedades, como cambios en el tamaño y en el recubrimiento. Estos cambios son debidos a interacciones con los fluidos o con los distintos componentes que se encuentran en los alimentos y por las condiciones fisiológicas del proceso.

El porcentaje de plata liberada durante la digestión "in vitro" es mayor para las nanopartículas de plata que para la plata iónica. Los porcentajes de plata liberada en el proceso sin centrifugar son mayores que los obtenidos en el proceso en el que se centrifuga. Esto se puede deber a que al centrifugar la plata precipite y se quede en el sólido. También observamos que las recuperaciones de la fase gástrica son menores que las de la fase oral cuando no se centrifuga. En la fase gástrica debido a la presencia de cloruros se produce la formación de AgCl lo que reduce el número de partículas en esta fase. La plata liberada en las muestras con Ag(I) y AgNps en la fase gástrica esta cerca del 70%. En la fase intestinal se recupera prácticamente el total de Ag(I) y AgNps, el 75% para la plata iónica y casi el 95% para AgNps.

6. BIBLIOGRAFÍA.

¹Dolez, P. Nanomaterials definitions, classifications and applications. *Nanoengineering. Global approaches to health and safety issues*. Elsevier, 2015, pp. 3-40.

²G. Scrinis, K. Lyons. The emerging Nano-Corporate paradigm: Nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems. *International journal of sociology of food and agricultura*, 2007, Vol. 15, pp. 1-44.

³Ferdous, Z. ; Nemmar, A. Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, 2375.

⁴L. Verde, A. L. P. Europeo, A. L. Comité, E. Y. Social, and E. Y. Al. Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, al consejo y al comité económico y social europeo. 2012, pp. 1-14

⁵S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, and J. R. Lead. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, vol. 27, pp. 1825– 1851.

⁶Chen, X. ; Schluesener, HJ. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*, 2008, vol. 176, pp. 1-12.

⁷<https://www.nanoobjects.info/en/nanoinfo/materials>

⁸Edwards-Jones, V. The Benefits of Silver in Hygiene, Personal Care and Healthcare. *Letters in applied microbiology*, 2009, vol. 49, pp. 147-152.

⁹Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G., Gómez, M.T.; Jiménez M.S.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J.R. Detection, characterization and quantification of inorganic Engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta*, 2016, vol. 904, pp. 10-32.

- ¹⁰Lopez-Sanz, S. ; Bernardo, FJG. ; Martin-Doimeadios, RCR. ; Rios, A. Analytical metrology for nanomaterials: Present achievements and future challenges. *Analytica Chimica Acta*, 2019, vol. 1059, pp. 1-15.
- ¹¹de Lozano, VS.; Morales, A.; Yáñez, MJ. Principios y práctica de la microscopía electrónica. UAT-CONICET- Bahía blanca, 2014
- ¹²de la Calle, I. ; Menta, M. ; Klein, M. ; Seby, F. Study of the presence of micro-and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques. *Food Chemistry*, 2018, vol. 266, pp. 133-145.
- ¹³Laborda, F. ; Gimenez-Ingalaturre, AC. ; Bolea, E. ; Castillo, JR. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2019, vol. 159, UNSP 105654.
- ¹⁴Martin-Yerga, D. Electrochemical Detection and Characterization of Nanoparticles with Printed Devices. *Biosensors-Basel*, 2019 , vol.9, 47.
- ¹⁵Soriano, ML. ; Zougagh, M. ; Valcarcel, M. ; Rios, A. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. *Talanta*, 2018, vol. 177, pp. 104-121.
- ¹⁶Monikh, FA. ; Chupani, L. ; Vijver, MG. ; Vancova, M. ; Peijnenburg, WJGM. Analytical approaches for characterizing and quantifying engineered nanoparticles in biological matrices from an (eco)toxicological perspective: old challenges, new methods and techniques. *Science of the Total Environment*, 2019, vol. 660, pp. 1283-1293.
- ¹⁷Marioli, M. ; Kok, WT. Continuous asymmetrical flow field-flow fractionation for the purification of proteins and nanoparticles. *Separation and Purification Technology*, 2020, vol. 242, a. 116744
- ¹⁸Zattoni, A.; Roda, B.; Borghi, F.; Marassi, V.; Reschiglian, P. Flow field-flow fractionation for the analysis of nanoparticles used in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, vol. 87, pp. 53-61.
- ¹⁹Ramírez-García, G., Trapiella-Alfonso, L., D'Orlyé, F., D'Orlyé, A. Electrophoretic Methods for Characterizing Nanoparticles and Evaluating Their Bio-interactions for Their Further Use as Diagnostic, Imaging, or Therapeutic Tools. *Capillary Electromigration Separation Methods, Elsevier*, 2018, pp. 397-421.
- ²⁰Philippe, A. ; Gangloff, M. ; Rakcheev, D. ; Schaumann, GE. Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry detector for analysis of colloids in environmental media - effects of colloid composition, coating and shape. *Analytical Methods*, 2014, vol. 6, pp. 8722-8728.
- ²¹Roman, M. ; Rigo, C. ; Castillo-Michel, H. ; Munivrana, I. ; Vindigni, V. ; Micetic, I. ; Benetti, F. ; Manodori, L. ; Cairns, WRL.. Hydrodynamic chromatography coupled to single-particle ICP-MS for the simultaneous characterization of AgNPs and determination of dissolved Ag in plasma and blood of burn patients. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, vol.408, pp. 5109-5124.

²²Skoog, D.A; Holler, F.M; Crouch, S.R. Espectroscopía atómica y Espectrometría de masas atómica. *Principios de Análisis Instrumental. Cengage LearningTM*, 2008, pp. 230-231.

²³Veverková, L.; Hradilová, S.; Milde, D.; Panáček, A.; Skopalová, J.; Kvítek, L.; Petrželová, K.; Zbořil, R. Accurate determination of silver nanoparticles in animal tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy*, 2014, vol. 102, pp.7-11.

²⁴Poitras, EP.; Levine, MA. ; Harrington, JM. ; Essader, AS. ; Fennell, TR.; Snyder, RW. ; Black, SL. ; Sumner, SS. ; Levine, KE. Development of an Analytical Method for Assessment of Silver Nanoparticle Content in Biological Matrices by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Biological trace element research*, 2015, vol.163, pp. 184-192.

²⁵Xue, Y.; Zhang, S.; Huang, Y.; Zhang, T.; Liu, X.; Hu, Y.; Zhangb, Z., Tanga, M. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J. Appl. Toxicol*, 2012, vol. 32, pp. 890–899.

²⁶Gan, JY. ; Sun, JD. ; Chang, XR. ; Li, WH. ; Li, JY. ; Niu, SY. ; Kong, L. ; Zhang, T. ; Wu, TS. ; Tang, M. Biodistribution and organ oxidative damage following 28 days oral administration of nanosilver with/without coating in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 2020, vol. 40, pp. 815-831.

²⁷Wu M, Guo H, Liu L, Liu Y, Xie L. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 2019 vol. 14, pp.4247-4259.

²⁸Vidmar, J., Buerki-Thurnherr, T. & Loeschner, K. Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2018, vol. 33, pp. 752-761.

²⁹Roman, M.; Rigo, C., Castillo-Michel, H.; Munivrana, I.; Vindigni, V.; Micetic, I.; Benetti, F.; Manodori, L.; Cairns, W.R.L. Hydrodynamic chromatography coupled to single-particle ICP-MS for the simultaneous characterization of AgNPs and determination of dissolved Ag in plasma and blood of burn patients. *Anal Bioanal Chem*, 2016, vol. 408, pp.5109-5124.

³⁰Karimi, MA. ; Mohammadi, SZ. ; Mohadesi, A. ; Hatefi-Mehrjardi, A. ; Mazloun-Ardakani, M. ; Korani, LS. ; Kabir, AA. Determination of silver(I) by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration using modified magnetite nanoparticles. *Scientia Iranica*, 2011, vol. 18, pp 790-796.

³¹Wu, Hz.; Meng, LF. Flame Atomic Absorption spectrometry determination of silver nanoparticles in environmental waters using dispersive liquid-liquid microextraction. *Applied Ecology and Environmental Research*, 2018, vol. 16, pp. 5705-5714

³²Choleva, TG. ; Tsogas, GZ. ; Giokas, DL. Determination of silver nanoparticles by atomic absorption spectrometry after dispersive suspended microextraction followed by oxidative dissolution back-extraction. *Talanta*, 2019, vol. 196, pp. 255-261.

- ³³Cueva, C.; Gil-Sánchez, I.; Tamargo, A.; Miralles, B.; Crespo, J.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V.. Gastrointestinal digestion of food-use silver nanoparticles in the dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract (simgi®). Impact on human gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, vol. 133, 110657.
- ³⁴Gerondi, F.; Aurélio, M.; Arruda, Z. Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry for determination of silver in biological materials. *Talanta*, 2012, vol. 97, pp. 395–399.
- ³⁵Lai, YJ. ; Dong, LJ. ; Zhou, HY. ; Yan, B. ; Chen, YS. ; Cai, YQ. ; Liu, JF. Coexposed nanoparticulate Ag alleviates the acute toxicity induced by ionic Ag⁺ in vivo. *Science of the Total Environment*, 2020, vol.723, 138050.
- ³⁶Daskalakis, KD.; O'Connor, TP.; Crecelius, EA. Evaluation of digestion procedures for determining silver in mussels and oysters. *Environ. Sci. Technol*, 1997, vol.31, pp. 2303-2306
- ³⁷Pindkaova, L.; Kasparkova, V.; Kejlova, K.; Dvorakova, M.; Krsek, D.; Jirova, D.; Kasparova, L. Behaviour of silver nanoparticles in simulated saliva and gastrointestinal fluids. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, vol.527, pp. 12-20.
- ³⁸Egger, L.; Schlegel, P.; Baumann, C. ; Stoffers, H. ; Guggisberg, D.; Brugger, C.; Durr, D.; Stoll, P.; Vergeres, G.; Portmann, R. Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion. *Food Research International*, 2017, vol.102, pp. 567-575.
- ³⁹Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 2014, vol. 5 pp. 1113–1124.
- ⁴⁰Kastner, C.; Lichtenstein, D.; Lampen, A.; Thunemann, AF. Monitoring the fate of small silver nanoparticles during artificial digestion. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, vol. 526, pp. 76-81.
- ⁴¹Rogers, KR.; Bradham, K.; Tolaymat, T. ; Thomas, DJ.; Hartmann, T.; Ma, LZ. ; Williams, A. Alterations in physical state of silver nanoparticles exposed to synthetic human stomach fluid. *Science of The Total Environment*, 2012, vol.420, pp. 334-339.
- ⁴²Ramos, K.; Ramos, L. ; Gomez-Gomez, MM. Simultaneous characterisation of silver nanoparticles and determination of dissolved silver in chicken meat subjected to in vitro human gastrointestinal digestion using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2017, vol.221, pp. 822-828.
- ⁴³Abad-Alvaro, I. ; Trujillo, C.; Bolea, E.; Laborda, F.; Fondevila, M.; Latorre, MA.; Castillo, JR. Silver nanoparticles-clays nanocomposites as feed additives: Characterization of silver species released during in vitro digestions. Effects on silver retention in pigs. *Microchemical Journal*, 2019, vol. 149, 104040.

7. ANEXOS

A) Estudios preliminares sobre la muestra: pH y conductividad.

Tabla A1: Pesos exactos de las muestras de pienso para realizar el estudio.

Muestra	Pienso (g)	Agua Mili-Q (g)
Pienso control 1	0,0500	50,0005
Pienso control 2	0,0501	49,9938
Pienso con Ag 1	0,0508	50,0423
Pienso con Ag 2	0,0506	50,0139
Pienso con Antibiótico 1	0,0490	50,1828
Pienso con Antibiótico 2	0,0515	49,9758
Pienso con Ag + Antibiótico 1	0,0492	50,0546
Pienso con Ag + Antibiótico 2	0,0491	49,9971

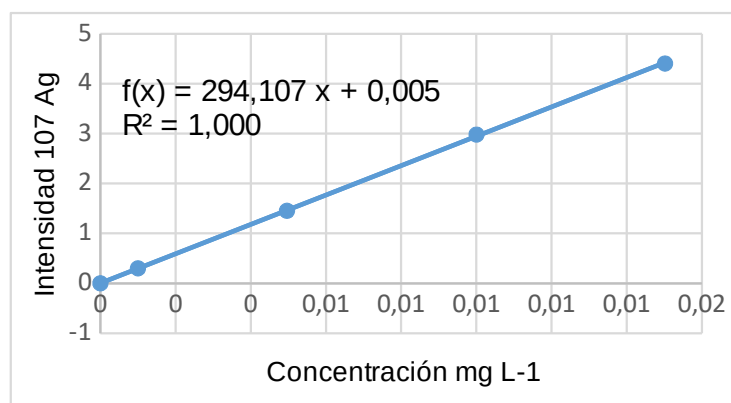
B) Determinación del contenido total de especies de plata en suplementos alimenticios para cerdos.

Tabla B1: Concentración de los diferentes patrones con sus correspondientes intensidades obtenidas en ICP-MS

Concentración teórica	Peso Ag (g)	Peso total (g)	Concentración real ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidad Rh	Intensidad de 107 Ag	Intensidad de 109 Ag
Blanco			0	395005,34	2101,5546	2102,3548
1 $\mu\text{g/L}$	0,2464	50,867	1,00	391021,85	119292,42	123259,69
5 $\mu\text{g/L}$	1,2374	51,429	4,96	392283,96	571788,81	590144,29
10 $\mu\text{g/L}$	2,4814	51,158	10,00	386890,58	1155107,5	1192995,9
15 $\mu\text{g/L}$	3,7365	51,311	15,02	388767,92	1714089,5	1757865,1

Tabla B2: Parámetros analíticos de la recta de calibrado .

Sensibilidad	294,11 mg L^{-1}
LD	$1,261 \times 10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$
LC	$4,203 \times 10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$
Rango lineal	De $4,203 \times 10^{-6}$ a $0,01502 \text{ mg L}^{-1}$



Gráfica B1: Recta de calibrado para determinación de Ag con ICP-MS.

B.1) Ataque en abierto

Tabla B.1.1: pesos exactos y concentraciones teóricas de las muestras para el ataque en abierto.

Muestra	Peso de muestra (g)	Peso de Ag (g)	Peso final (g)	Factor de dilución	Concentración teórica (mg L ⁻¹)
Blanco ataque			15,00	22,10	
Recuperación de ataque en blanco		0,1732	15,07	21,49	0,0053
Control 1	0,0992		14,99	18,68	
Control 2	0,0999		15,03	20,50	
Recuperación medida 2		0,7777	15,03	19,74	
Pienso plata 1	0,1042		15,09	20,02	0,0069
Pienso plata 2	0,0997		14,99	19,47	0,0068
Recuperación ataque muestra	0,1056	0,1711	15,01	21,41	0,0119
Recuperación medida pienso plata 1	0,1042	0,8012	15,0934	18,94	0,0124

Tabla B.1.2: Concentraciones y recuperaciones del ataque en abierto.

Muestra	Intensidad $^{107}\text{Ag} / \text{Rh}$	Concentración mg L^{-1}	DSR %	Concentración mg g^{-1}	Recuperación	DSR %
Blanco ataque	0,1616	$5,341 \times 10^{-4}$	0,12			
Recuperación de ataque en blanco	2,064	$7,004 \times 10^{-3}$	0,61		117,8	0,47
Control 1	0,1500	$4,947 \times 10^{-4}$	0,21	$1,404 \times 10^{-3}$		
Control 2	0,2131	$7,093 \times 10^{-4}$	0,51	$2,200 \times 10^{-3}$		
Recuperación medida de control 2	1,957	$6,638 \times 10^{-3}$	0,45	0,01944	120,2	0,50
Pienso plata 1	0,7093	$2,397 \times 10^{-3}$	0,38	$6,950 \times 10^{-3}$		
Pienso plata 2	0,1956	$6,496 \times 10^{-4}$	0,13	$1,902 \times 10^{-3}$		
Recuperación ataque muestra	0,3608	$1,212 \times 10^{-3}$	0,70	$3,688 \times 10^{-3}$	31,01	0,70
Recuperación medida de pienso plata 1	2,676	$9,085 \times 10^{-3}$	1,3	0,02492	73,18	1,3

B.2) Ataque por microondas**Tabla B.2.1:** Parámetros instrumentales del ICP-MS para determinar la plata liberada tras el ataque.

Flujo de gas del nebulizador	1,04 L/min
Voltaje	14, 5 V
Detector	dual
Barridos	20
Replicas	5
Lecturas por replica	1
Dual time	50 milisegundos

Tabla B.2.2: pesos exactos y concentraciones teóricas de las muestras para el ataque por microondas.

Muestra	Peso de muestra (g)	Peso de Ag (g)	Peso final (g)	Factor de dilución	Concentración teórica (mg L ⁻¹)
Blanco ataque			52,5341	8,1010	
Recuperación de ataque en blanco		0,1984	21,624	8,1970	0,0048
Control 1	0,1361		50,559	7,8858	
Control 2	0,1347		49,4752	8,2802	
Control 3	0,1187		53,4272	8,1540	
Pienso plata 1	0,1085		52,0678	8,1160	0,0051
Pienso plata 2	0,0925		21,0098	8,3054	0,0044
Pienso plata 3	0,1248		51,1313	8,0343	0,0061
Recuperación ataque muestra	0,1127	0,1969	50,0478	8,1542	0,0104
Recuperación medida pienso plata 2	0,0925	1,2485	51,0098	6,7688	0,0104

Tabla B.2.3 : Concentraciones y recuperaciones de las muestras en el ataque por microondas.

Muestra	Intensidad ¹⁰⁷ Ag / Rh	Concentración mg L ⁻¹	DSR %	Concentración mg g ⁻¹	Recuperación	DSR%
Blanco ataque	0,0233	6,580 x 10 ⁻⁵	2,1			
Recuperación de ataque en blanco	1,080	3,730x10 ⁻³	0,59		78,36	0,59
Control 1	0,0072	7,154 x 10 ⁻⁶	13			
Control 2	0,0088	1,275 x 10 ⁻⁵	2,6			
Control 3	0,0199	5,204 x 10 ⁻⁵	1,3			
Pienso plata 1	0,8948	3,082x10 ⁻³	0,90	0,01200		
Pienso plata 2	0,8095	2,784x10 ⁻³	0,26	0,01275		
Pienso plata 3	1,100	3,774x10 ⁻³	2,2	0,01242		
Recuperación ataque muestra	2,028	6,988x10 ⁻³	0,75	0,02531	67,05	0,75
Recuperación medida pienso plata 2	2,354	8,095x10 ⁻³	1,2	0,03022	78,11	1,2

C) Determinación de la cantidad de Ag liberado en agua mediante EAA-llama e ICP-MS.

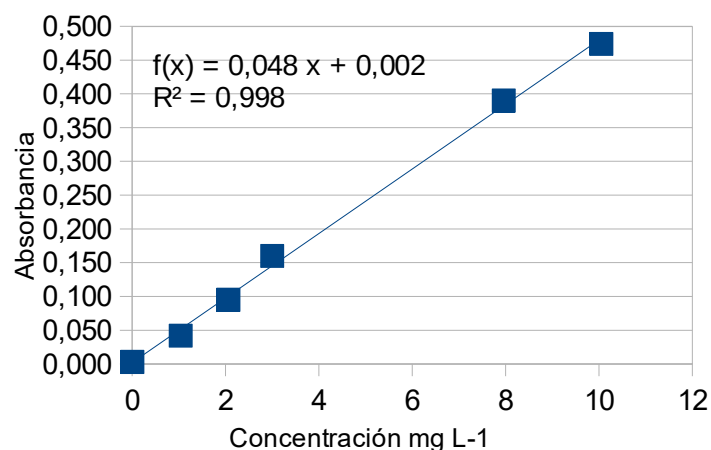
C.1) Determinación por EAA-Llama

Tabla C.1.1: Parámetros instrumentales del espectrofotometro de EAA-llama empleados para determinar la cantidad de plata liberada tras la lixiviación.

Lámpara	Cátodo de Ag
Longitud de onda	328 nm
Ranura	0,8 mm
Caudal aire/acetileno	10/2,5 L/Min
Nº de replicas	3
Nº replicas blanco	10
Tiempo de integración	1 seg
Tiempo de retraso	3 seg

Tabla C.1.2 : Recta de calibrado preparada con HNO₃ al 10% y sus absorbancias.

Concentración teórica	Patrón Ag ⁺ de 80 mg L ⁻¹ (g)	HNO ₃ 10% (g)	Peso total (g)	Concentración real (mg L ⁻¹)	Absorbancia	SD	DSR %
Blanco	0,0000	1,586	15,01	0	0,003	0,0003	10
1 mg/L	0,1941	1,793	14,99	1,04	0,042	0,0002	0,48
2 mg/L	0,3867	1,975	15,05	2,05	0,095	0,0099	10
3 mg/L	0,5617	2,148	14,99	3,00	0,160	0,0013	0,81
4 mg/L	0,7544	2,346	15,00	4,02	0,253	0,0042	1,7
5 mg/L	0,9525	2,529	15,02	5,07	0,387	0,0109	2,8
7 mg/L	1,4890	3,077	14,97	7,96	0,390	0,0181	4,6
10 mg/L	1,8866	3,464	15,02	10,05	0,474	0,022	0,46



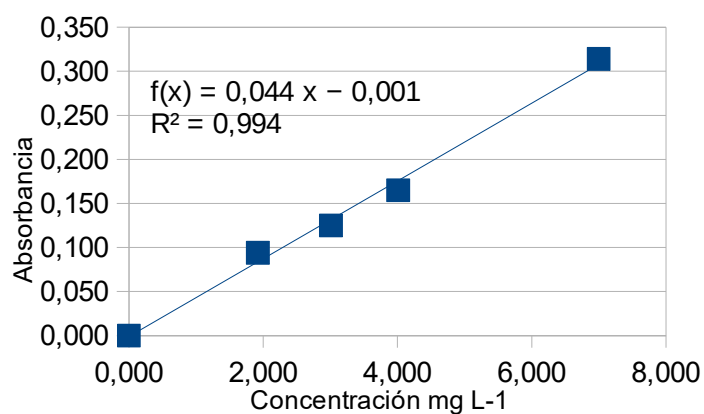
Gráfica C.1.1: Recta de calibrado preparada con HNO₃ al 10%.

Tabla C.1.3: Parámetros analíticos de la recta de calibrado con HNO₃ al 10%.

Sensibilidad	0,048 mg L ⁻¹
LD	0,019 mg L ⁻¹
LC	0,063 mg L ⁻¹
Rango lineal	De 0,063 a 10,05 mg L ⁻¹

Tabla C.1.4: Parámetros analíticos de la recta de calibrado con HNO₃ al 1%.

Concentración teórica	Patrón Ag ⁺ de 80 mg L ⁻¹ (g)	Peso total (g)	Concentración real (mg L ⁻¹)	Absorbancia	SD	DSR %
Blanco	0,0000	15,00	0	0,000	0,0005	0%
1 mg/L	0,3166	14,99	1,69	0,039	0,0006	1,5%
2 mg/L	0,3618	15,06	1,92	0,094	0,0027	2,9%
3 mg/L	0,5636	14,99	3,01	0,125	0,0003	0,24%
4 mg/L	0,7506	14,99	4,01	0,165	0,0123	7,5%
5 mg/L	0,9386	15,08	4,98	0,292	0,0084	2,9%
7 mg/L	1,3113	14,99	7,00	0,314	0,0241	7,7%
10 mg/L	1,9073	15,00	10,17	0,203	0,0009	0,44%



Gráfica C.1.2: Recta de calibrado preparada con HNO₃ al 1%

Tabla C.1.5: Parámetros analíticos de la recta de calibrado con HNO₃ al 1%

Sensibilidad	0,044 mg L ⁻¹
LD	0,034 mg L ⁻¹
LC	0,113 mg L ⁻¹
Rango lineal	De 0,113 a 7 mg L ⁻¹

Tabla C.1.6: Comparación de pendientes de la recta de calibrado.

	VALOR 1	VALOR 2
Magnitud	0,0441	0,0478
Incertidumbre	0,00278	0,00120
Grados de libertad	3	4
Parametro z o t	1,22	
Probabilidad de que la diferencia sea aleatoria	COLAS 2	
Asumiendo distribución Z	22,17%	

Tabla C.1.7: Pesos exactos, concentraciones y absorbancias de la recta de calibrado para la determinación mediante EAA-llama.

Concentración teoría	Patrón Ag ⁺ de 100 mg L ⁻¹ (g)	Peso total (g)	Concentración real (mg L ⁻¹)	Absorbancia	SD	DSR %
Blanco	0,0000	15,03	0	0,001	0,0006	86,6%
0,5 mg/L	0,0738	15,03	0,49	0,014	0,0010	7,14%
1 mg/L	0,1502	15,04	1,00	0,032	0,0006	1,78%
2 mg/L	0,3007	14,99	2,01	0,070	0,0000	0%
3 mg/L	0,4559	15,08	3,02	0,105	0,0010	0,95%
4 mg/L	0,6060	15,12	4,01	0,137	0,0006	0,42%

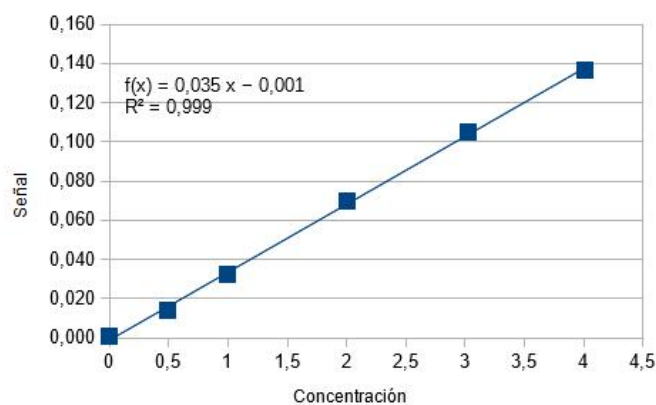
**Gráfica C.1.3:** Recta de calibrado para el estudio de liberación de plata en agua.

Tabla C.1.8: Parámetros analíticos de la recta de calibrado.

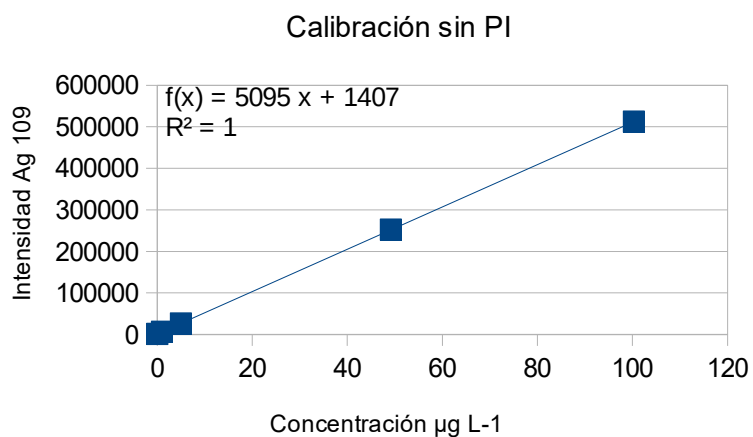
Sensibilidad	0,035 mg L ⁻¹
LD	0,050 mg L ⁻¹
LC	0,167 mg L ⁻¹
Rango lineal	De 0,167 a 4,01 mg L ⁻¹

C.2) Determinación por ICP-MS**Tabla C.2.1:** Parámetros instrumentales del ICP-MS empleados para determinar la cantidad de plata liberada tras la lixiviación.

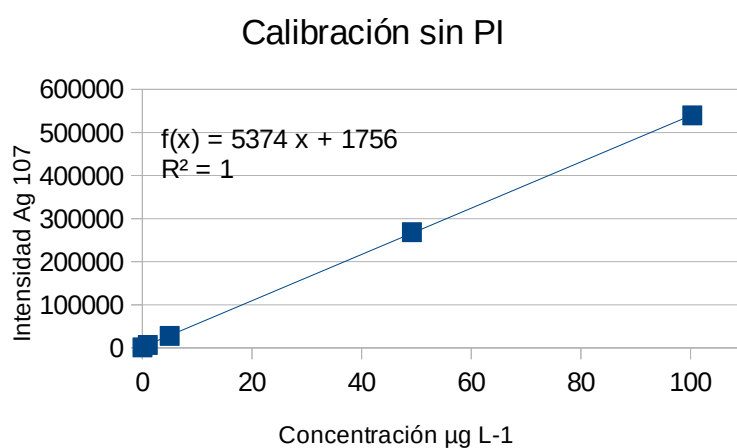
Flujo de gas del nebulizador	0,8 L/min
Flujo de gas plásmógeno	15 L/min
Voltaje lente	6 V
Detector	Dual
Barridos	20
Replicas	5
Lecturas por replica	1
Dual time	50 milisegundos

Tabla C.2.2: Recta de calibrado con sus intensidades para el estudio con ICP-llama.

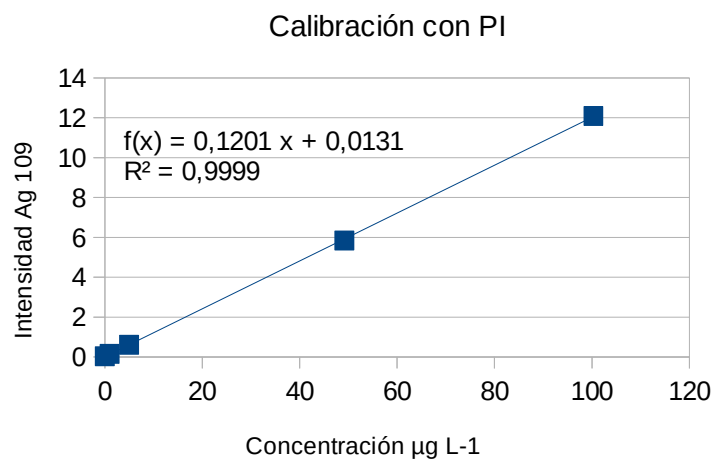
Concentración teórica (µg L ⁻¹)	Ag 1 µg L ⁻¹	Peso total (g)	Concentración real (µg L ⁻¹)	Intensidad Rh	Intensidad Ag 107	Intensidad Ag 109
0	0	50,0025	0	41903	1326	1306
1	0,0487	50,0287	0,9676	43168	6684	6426
5	0,2509	49,9986	4,988	43416	28039	26583
50	2,4784	50,0960	49,18	43188	268371	252406
100	5,0462	50,0058	100,3	42354	539677	512222



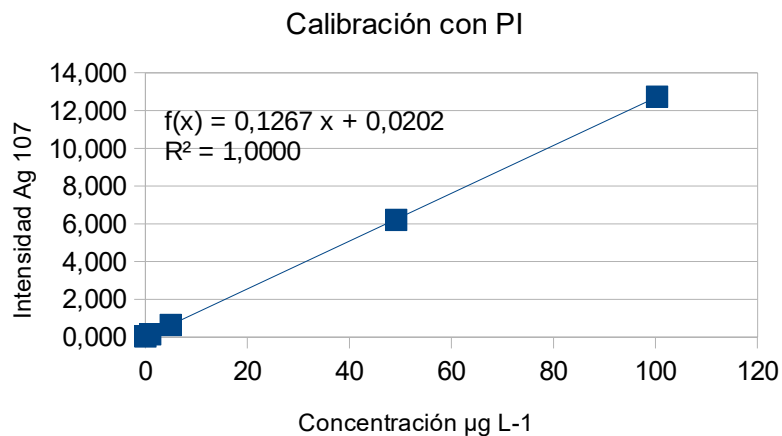
Gráfica C.2.1: Recta calibrado para ^{109}Ag sin PI.



Gráfica C.2.2: Recta calibrado para ^{107}Ag sin PI.



Gráfica C.2.3: Recta calibrado para ^{109}Ag con PI.



Gráfica C.2.4: Recta calibrado para ^{107}Ag con PI.

Tabla C.2.3: Parámetros analíticos de la recta de calibrado para ^{109}Ag sin PI.

Sensibilidad	$5095 \mu\text{g L}^{-1}$
LD	$0,03 \mu\text{g L}^{-1}$
LC	$0,10 \mu\text{g L}^{-1}$
Rango lineal	De $0,10$ a $100,3 \mu\text{g L}^{-1}$

D) Determinación de la cantidad de Ag liberado en procesos de digestión in vitro a partir de patrones de Ag(I) y AgNps.

Tabla D1: Pesos exactos de las disoluciones empleadas para preparar la fase oral con centrifugación.

Muestra	Ag (g)	AgNps (g)	SSF (g)	CaCl_2 (g)	Peso final (g)
Blanco			3,507	0,0262	9,9972
Ag 1	0,5011		3,4868	0,0262	10,0155
Ag 2	0,4983		3,6645	0,0258	9,9906
AgNps 1		0,4985	3,4713	0,0218	9,9963
AgNps 2		0,4900	3,4739	0,0228	10,0583

Tabla D2: Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro para la fase oral con centrifugación.

Muestra	Abs promedio	SD	DSR %
Blanco	0,000	0,0002	48,4
Ag 1	0,004	0,0004	9,0
Ag 2	0,004	0,0003	8,2
AgNps 1	0,010	0,0005	4,9
AgNps 2	0,008	0,0006	6,7

Tabla D3: Pesos exactos de las disoluciones empleadas para preparar la fase gástrica con centrifugación.

Muestra	Ag (g)	AgNps (g)	SSF(g)	CaCl ₂ (g)	Mili-Q (g)	SGF(g)	CaCl ₂ (g)	Pepsina(g)	HCl (g)	Peso final (g)
Blanco			3,4426	0,0262	6,5157	7,1050	0,0043	1,5984	0,2030	20,0111
Ag 1	0,5173		3,4901	0,0261	5,9614	7,2440	0,0041	1,5783	0,1951	20,0474
Ag 2	0,5105		3,4856	0,0219	6,0259	7,1810	0,0042	1,5159	0,2538	20,0763
Ag 3	0,5063		3,4794	0,0262	5,9947	7,2028	0,0045	1,5511	0,1964	20,0928
AgNps 1		0,5047	3,4726	0,0211	5,9987	7,1471	0,0042	1,5477	0,2516	20,0613
AgNps 2		0,4970	3,4666	0,0223	6,0745	7,3593	0,0040	1,3071	0,2836	20,0585

Tabla D4: Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro para la fase gástrica con centrifugación.

Muestra	Abs promedio	SD	DSR %
Blanco	0,001	0,0005	62,2
Ag 1	0,010	0,0003	2,9
Ag 2	0,010	0,0009	8,9
Ag 3	0,012	0,0003	2,2
AgNps 1	0,006	0,0001	2,1
AgNps 2	0,005	0,0005	11,2

Tabla D5: Pesos exactos de las disoluciones empleadas para preparar la fase intestinal con centrifugación.

Muestra	Ag (g)	AgNps (g)	SSF(g)	CaCl ₂ (g)	Mili-Q (g)	SGF(g)	CaCl ₂ (g)	Pepsina (g)	HCl (g)	Mili-Q (g)	SIF (g)	CaCl ₂ (g)	Bilis (g)	Pancreatina (g)	NaOH (g)	Peso final (g)
Blanco			3,4767	0,0258	6,5993	7,2649	0,0055	1,5559	0,1989	10,0449	10,6352	0,0373	2,3176	5,0750	0,1685	40,1588
Ag 1	0,4920		3,4449	0,0256	6,1588	7,2668	0,0053	1,5646	0,1997	10,0949	10,4893	0,0354	2,4266	5,0533	0,1550	40,3590
Ag 2	0,5025		3,3958	0,0261	6,1193	7,2447	0,0058	1,5527	0,1981	10,0176	10,5387	0,0418	2,4169	5,0627	0,1494	40,2337
Ag 3	0,5020		3,4402	0,0260	6,0587	7,2286	0,0056	1,5550	0,1978	10,0075	10,6015	0,0398	2,4413	5,0724	0,1520	40,1378
AgNps 1		0,4841	3,4446	0,0259	6,4303	7,2332	0,0053	1,5482	0,1998	10,0182	10,5124	0,0404	2,4413	5,0751	0,1657	40,5703
AgNps 2		0,4915	3,4433	0,0254	6,0747	7,2756	0,0058	1,5532	0,1984	9,9912	10,5964	0,0403	2,4589	5,0758	0,1214	40,0548

Tabla D6: Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro para la fase intestinal con centrifugación.

Muestra	Abs promedio	SD	DSR %
Blanco	0,003	0,001	17,32
Ag 1	0,063	0,001	0,91
Ag 2	0,064	0,001	0,91
Ag 3	0,064	0,001	1,56
AgNps 1	0,018	0,001	3,15
AgNps 2	0,019	0,001	5,26

Tabla D7: Pesos exactos de las disoluciones empleadas para preparar la fase oral sin centrifugación.

Muestra	Ag (g)	AgNps (g)	SSF (g)	CaCl ₂ (g)	Peso final (g)
Blanco			3,4358	0,0248	10,1362
Ag 1	0,5001		3,4734	0,0297	10,0014
Ag 2	0,4929		3,4562	0,0262	10,0805
Ag 3	0,4942		3,0977	0,0276	10,0205
AgNps 1		0,4917	3,4220	0,5118	10,1392
AgNps 2		0,4918	3,8618	0,0209	10,0170

Tabla D8: Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro para la fase oral sin centrifugación.

Muestra	Abs promedio	SD	DSR %
Blanco	0,002	0,001	34,6
Ag 1	0,202	0,001	0,28
Ag 2	0,198	0,001	0,50
Ag 3	0,198	0,001	0,50
AgNps 1	0,048	0,001	2,42
AgNps 2	0,049	0,001	1,17

Tabla D9: Pesos exactos de las disoluciones empleadas para preparar la fase gástrica sin centrifugación.

Muestra	Ag (g)	AgNps (g)	SSF(g)	CaCl ₂ (g)	Mili-Q (g)	SGF(g)	CaCl ₂ (g)	Pepsina(g)	HCl (g)	Peso final (g)
Blanco			3,4368	0,0221	6,6218	7,2638	0,0043	1,5677	0,2005	20,3694
Ag 1	0,4958		3,4592	0,0231	5,9970	7,3513	0,0045	1,5680	0,1991	20,0637
Ag 2	0,5088		3,4713	0,0291	6,0246	7,1180	0,0041	1,5790	0,2003	20,0469
Ag 3	0,4990		3,4853	0,0222	6,1003	7,3671	0,0042	1,5711	0,2007	20,1141
AgNps 1		0,4842	3,4835	0,0199	6,0181	7,3761	0,0043	1,6152	0,2002	20,0772
AgNps 2		0,4989	3,4793	0,0254	6,0237	7,2873	0,0044	1,5643	0,1970	20,2839

Tabla D10: Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro para la fase gástrica sin centrifugación.

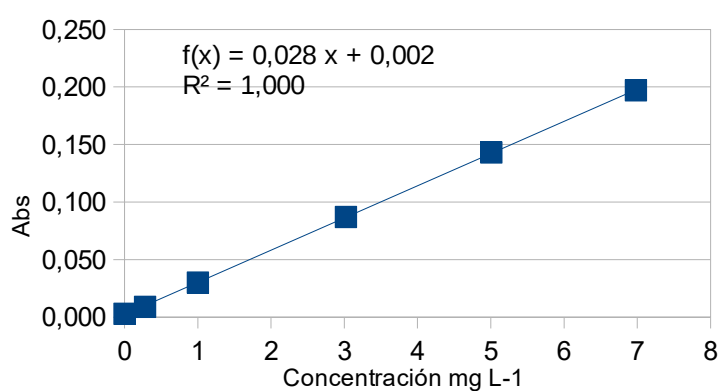
Muestra	Abs promedio	SD	DSR %
Blanco	0,002	0,001	50,0
Ag 1	0,010	0,0003	1,03
Ag 2	0,010	0,0009	0,59
Ag 3	0,012	0,0003	1,19
AgNps 1	0,006	0,0001	2,84
AgNps 2	0,005	0,0005	5,00

Tabla D11: Pesos y concentración exacta y absorbancias de la recta de calibrado para la determinación mediante EAA-llama de especies de plataa en la fase oral y gástrica con centrifugación.

Concentración teoría mg L ⁻¹	Patrón Ag ⁺ de 100 mg L ⁻¹ (g)	Peso total (g)	Concentración real (mg L ⁻¹)	Absorbancia	SD	DSR %
Blanco	0,0000	15,0247	0	0,003	0,0005	17,7
0,25	0,0424	15,1908	0,279	0,009	0,0003	2,8
1	0,1525	15,2290	1,001	0,030	0,0006	1,9
3	0,4543	15,0325	3,022	0,087	0,0006	0,7
5	0,7503	14,9834	5,008	0,143	0,0007	0,5
7	1,0506	15,0458	6,983	0,197	0,0004	0,9

Tabla D12: Parámetros analíticos de la recta de calibrado para la determinación de plata liberada en la fase oral y gástrica con centrifugación.

Sensibilidad	0,028 mg L ⁻¹
LD	0,054 mg L ⁻¹
LC	0,179 mg L ⁻¹
Rango lineal	De 0,179 a 6,983 mg L ⁻¹



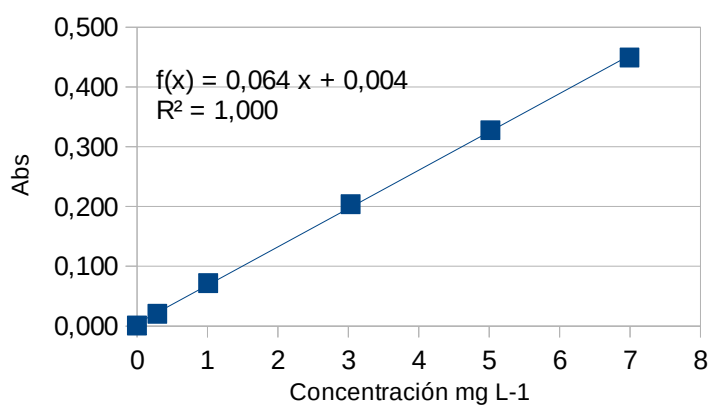
Gráfica D1: Recta de calibrado para la determinación de plata liberada en la fase oral y gástrica con centrifugación.

Tabla D13: Pesos y concentración exacta y absorbancias de la recta de calibrado para la determinación mediante EAA-llama de especies de plata en la fase intestinal con centrifugación.

Concentración teorica mg L ⁻¹	Patrón Ag ⁺ de 100 mg L ⁻¹ (g)	Peso total (g)	Concentración real (mg L ⁻¹)	Absorbancia	SD	DSR %
Blanco	0,0000	15,0247	0	0,001	0,001	47,1
0,25	0,0434	15,0021	0,2893	0,021	0,001	2,79
1	0,1517	14,9987	1,011	0,072	0,001	0,81
3	0,4554	15,0192	3,032	0,204	0,001	0,28
5	0,7552	15,0515	5,017	0,328	0,002	0,47
7	1,0480	14,9878	6,992	0,449	0,002	0,39

Tabla D14: Parámetros analíticos de la recta de calibrado para la determinación de plata liberada en la fase intestinal con centrifugación.

Sensibilidad	0,064 mg L ⁻¹
LD	0,047 mg L ⁻¹
LC	0,156 mg L ⁻¹
Rango lineal	De 0,156 a 6,992 mg L ⁻¹



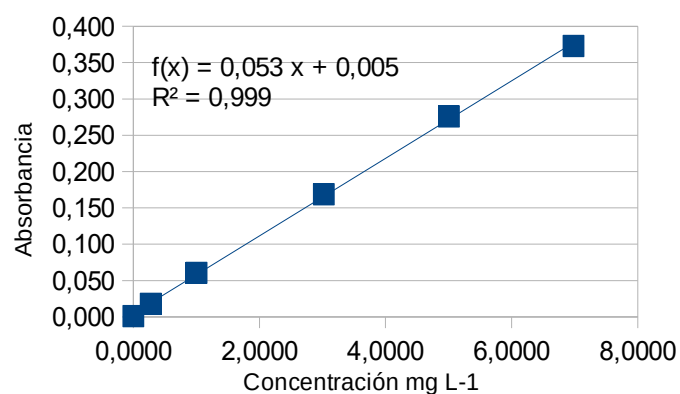
Gráfica D2: Recta de calibrado para la determinación de plata liberada en la fase intestinal.

Tabla D15: Pesos y concentración exacta y absorbancias de la recta de calibrado para la determinación mediante EAA-llama de especies de plata en la fase oral y gástrica sin centrifugación.

Concentración teorica mg L ⁻¹	Patrón Ag ⁺ de 100 mg L ⁻¹ (g)	Peso total (g)	Concentración real (mg L ⁻¹)	Absorbancia	SD	DSR %
Blanco	0,0000	15,0247	0	0,001	0,001	79,7
0,25	0,0424	15,1908	0,279	0,018	0,000	0
1	0,1525	15,2290	1,001	0,061	0,001	0,95
3	0,4543	15,0325	3,022	0,169	0,001	0,34
5	0,7503	14,9834	5,008	0,276	0,000	0
7	1,0506	15,0458	6,983	0,373	0,001	0,27

Tabla D16: Parámetros analíticos de la recta de calibrado para la determinación de plata liberada en la fase oral y gástrica sin centrifugación.

Sensibilidad	0,053 mg L ⁻¹
LD	0,057 mg L ⁻¹
LC	0,189 mg L ⁻¹
Rango lineal	De 0,189 a 6,983 mg L ⁻¹



Gráfica D3: Recta de calibrado para la determinación de plata liberada en la fase oral y gástrica sin centrifugación.

Tabla D17: Parámetros instrumentales del espectrófotometro de EAA-llama empleados para determinar la cantidad de plata liberada tras la lixiviación.

Lámpara	Cátodo de Ag
Longitud de onda	328 nm
Ranura	0,8 mm
Caudal aire/acetileno	10/2,5 L/Min
Nº de replicas	3
Nº replicas blanco	10
Tiempo de integración	1 seg
Tiempo de retraso	3 seg